

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1931

N° 52

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1931

PAR

Abdullah HAMEDY

Né le 11 Novembre 1902, à Téhéran (Perse)

DE L'APTITUDE DES ANIMAUX A LA PRODUCTION DES ANTITOXINES DIPHTHÉRIQUE ET TÉTANIQUE

*Travail de l'Institut Pasteur de Paris
(Annexe de Garches)*

JURY { *Président* : LEMIERRE professeur à la Faculté de Médecine
 { PANISSET { professeurs à l'École Nationale
 Assesseurs : { NICOLAS { Vétérinaire d'Alfort

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE

1931

DE L'APTITUDE DES ANIMAUX
A LA
PRODUCTION DES ANTITOXINES
DIPHTHÉRIQUE ET TÉTANIQUE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552210_0014

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1931

N° 52

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1931

PAR

Abdullah HAMEDY

Né le 11 Novembre 1902, à Téhéran (Perse)

DE L'APTITUDE DES ANIMAUX A LA PRODUCTION DES ANTITOXINES DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE

*Travail de l'Institut Pasteur de Paris
(Annexe de Garches)*

JURY { *Président :* LEMIERRE professeur à la Faculté de Médecine
 { PANISSET { professeurs à l'École Nationale
 Assesseurs : { NICOLAS { Vétérinaire d'Alfort

• PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE

1931

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général
honoraire des Ecoles Vétérinaires ; P.-J. CADIOT,
H. VALLÉE

PROFESSEURS ET CHARGES DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques..	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et Chimie médicales, toxicologie, pharmacie.....	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique; Zoologie.	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique; sémiologie et propédeutique, jurisprudence.	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale. médecine opératoire et ferrure.....	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique; médecine opératoire, obstétrique.	LESBOUYRIES.
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique..	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique ; autopsies.....	PETIT.
Zootchnie et économie rurale.....	DECHAMBRE.
Agronomie, botanique et hygiène; matière médicale.	DECHAMBRE et HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale.	VERGE.

PROFESSEUR AGREGÉ

M. LESBOUYRIES

CHEF DE TRAVAUX AGREGÉ

M. SIMONNET

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BRION, MONVOISIN, MOUSSU (R.), VALADE

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les
opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées
doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles
n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



A MON PERE ET A MA MERE

En gage de mon amour filial.

A MES FRERES ET A MA SOEUR

A Son Excellence MIRZA HOSSEIN KHAN ALA
Ministre plénipotentiaire de Perse en France

A Monsieur SAMSAM-OL-MOLK, BAYAT
Sous-Secrétaire d'Etat
au Ministère d'Economie nationale de Perse

qui nous a conseillé de venir perfectionner nos
études microbiologiques en France.
Qu'il trouve ici l'expression de notre recon-
naissance infinie.

A MES AMIS

A Monsieur le PROFESSEUR LEMIERRE

Médecin des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'honneur

*qui nous fait le grand honneur d'accepter la
présidence de notre jury.*

A Monsieur le PROFESSEUR PANISSET

Chevalier de la Légion d'honneur

A Monsieur le PROFESSEUR NICOLAS

Directeur de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

Officier de la Légion d'honneur

A TOUS MES MAITRES D'ALFORT

A TOUS MES MAITRES

DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

A Monsieur le PROFESSEUR RAMON
de l'Institut Pasteur de Paris
Chevalier de la Légion d'honneur

C'est lui qui nous a donné l'idée de ce travail.

Il a facilité notre tâche en mettant à notre disposition ses notes, ses recherches, ses publications et son service.

Il a toujours été pour nous un Maître extrêmement bienveillant.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle il nous a dirigé dans l'élaboration de cette thèse, à l'Institut Pasteur de Garches, où il nous a fait l'honneur de nous accueillir.

INTRODUCTION

On sait, depuis la découverte de BEHRING et KITASATO, que l'introduction d'un antigène toxique dans l'organisme animal fait apparaître, dans certaines conditions, une antitoxine spécifique.

L'organisme ainsi traité acquiert la propriété de résister désormais à une nouvelle agression de la toxine en question. C'est cet état de résistance particulière de l'organisme vis-à-vis de l'antigène toxique introduit qui représente l'immunité antitoxique.

L'antitoxine se révèle dans l'organisme par les propriétés particulières du sérum sanguin : le pouvoir antitoxique, le pouvoir floculant, etc., etc.

D'autre part l'immunité antitoxique acquise est exclusivement liée à l'introduction de l'antigène toxique dans l'organisme de sorte que l'on peut dire : il n'y a pas d'antitoxine sans antigène d'origine toxique. Mais toutes les substances toxiques ne sont pas susceptibles de provoquer l'apparition d'antitoxine dans l'organisme, d'où la nécessité d'une étude rapide des antigènes générateurs d'antitoxine : les toxines microbiennes, végétales et animales.

Mais cette introduction de l'antigène dans l'organisme, aussi nécessaire soit-elle, n'est pas suffisante à elle seule pour provoquer l'apparition de l'antitoxine.

Dans un chapitre consacré à la production de l'antitoxine dans la série animale, nous allons voir en détail qu'un grand nombre d'organismes sont indifférents à l'inoculation de cet antigène ; la toxine inoculée circule dans leur sang ou se localise dans les organes en y restant pendant longtemps, toujours

à l'état de toxine non transformée et sans provoquer l'apparition de la moindre trace d'antitoxine. En un mot, pour que cette production ait lieu, il faut que l'organisme de l'animal récepteur soit apte à réagir.

C'est ainsi que l'espèce à laquelle appartient l'animal en question, la sensibilité naturelle plus ou moins grande de l'organisme, l'individualité et nombre de facteurs principaux et secondaires ont une influence plus ou moins marquée dans la production de l'antitoxine et c'est cet ensemble de facteurs qui constituent l'aptitude des animaux à la production de l'antitoxine.

Aussi dans la réalisation d'immunité antitoxique et dans la production de l'antitoxine spécifique, il y a, en premier lieu, deux grands facteurs principaux qui interviennent :

- 1° L'antigène d'origine toxique ;
- 2° L'animal.

A vrai dire, le travail que nous exposerons ici ne se réfère qu'au second de ces deux facteurs ; c'est surtout sur l'animal que nous insisterons spécialement.

Mais pour fixer nos idées et pour la bonne compréhension de notre travail, nous avons réservé dans une première partie de notre exposé, où nous parlions en résumé de l'antitoxine, un chapitre spécial consacré à l'étude des antigènes générateurs d'antitoxine et nous terminerons cette première partie par l'étude de la production de l'antitoxine dans la série animale.

La seconde partie sera consacrée entièrement à l'étude de l'aptitude des animaux, le cheval en particulier, à la production des antitoxines. Elle constitue en partie nos recherches personnelles.

Enfin, dans un appendice ajouté à la fin de ce travail, nous donnerons la technique courante et pratique de titrage de sérum antitoxique par deux méthodes différentes employées aujourd'hui dans tous les grands laboratoires de sérothérapie :

- 1° La méthode sur les cobayes, d'après EHRLICH ;

2° La méthode de floculation, d'après RAMON.

Avant d'entreprendre l'étude de ce travail, nous nous ferons un devoir de témoigner ici notre gratitude à nos maîtres d'Alfort.

Nous tenons d'abord à remercier M. le Professeur PANISSET, ce maître si aimable et si accueillant, qui nous a prodigué son enseignement sans ménager son temps ni sa peine et a su, pendant quatre ans, assurer et parachever notre formation professionnelle.

Qu'il veuille bien accepter ici l'hommage de notre très respectueuse reconnaissance.

Nous remercions également M. le Professeur NICOLAS, directeur de l'école d'Alfort, qui nous a accueilli avec beaucoup de bienveillance à notre arrivée en France ; nous en conserverons pendant toute notre carrière un reconnaissant souvenir.

Nous remercions aussi M. DUMAS, de l'Institut Pasteur de Paris, pour son aimable accueil pendant toute la durée des cours de microbiologie de 1931.

Je ne voudrais pas terminer ces lignes sans rappeler mes amis d'enfance D^r CHAMS, professeur agrégé de l'Université de Paris, ainsi que le docteur SAMARY.

PREMIERE PARTIE

LES ANTITOXINES

RICHET et HÉRICOURT ont signalé les premiers le pouvoir préventif du sang des animaux rendus réfractaires contre une septicémie spéciale qu'ils ont étudiée.

HOFFMAN, en 1887, annonce que des cobayes inoculés avec les cultures âgées de bacille diphtérique se montraient réfractaires à l'inoculation de cultures fraîches et virulentes.

FRANKEL, en 1890, arrive au même résultat en injectant aux cobayes de la toxine chauffée à 70°. Cette température détruisait, d'après l'auteur, la substance toxique et respectait une substance vaccinale qui l'accompagnait.

Mais ce n'est qu'après la note de MM. BEHRING et KITASATO en 1890 que l'antitoxine a été connue ainsi que le pouvoir immunisant du sang des animaux immunisés contre le tétanos et que la sérumthérapie, comme disait M. Roux, s'est révélée avec toute son importance.

A titre documentaire nous allons montrer comment les auteurs allemands expliquaient dans leur première communication la présence de l'antitoxine dans le sang des animaux réfractaires au tétanos :

« 1° Le sang d'un lapin réfractaire au tétanos est capable de détruire les toxines du tétanos ;

« 2° Cette propriété peut se démontrer pour le sang extrait des vaisseaux et pour le sérum débarrassé de toute cellule qui en provient ;

« 3° Cette propriété est si durable qu'elle persiste même après la transfusion dans l'organisme d'autres animaux ; elle permet ainsi un traitement de l'affection ;

« 4° Cette propriété manque dans le sang d'animaux non réfractaires et le poison tétanique peut se retrouver dans le sang et les autres humeurs. »

Et dans une note ultérieure, BEHRING s'exprime :

« Dans notre travail en commun avec KITASATO nous n'avons peut-être pas été suffisamment explicites sur l'influence curatrice de la transformation du sang des lapins réfractaires. Les souris ne sont pas seulement rendues réfractaires elles-mêmes, non seulement elles n'éprouvent pas d'accidents tétaniques si, aussitôt après l'infection elles reçoivent dans le péritoine du sang de lapin réfractaire, mais elles peuvent être guéries par la transfusion quand les accidents sont déjà très accentués. Une souris a plusieurs de ses extrémités très contracturées, elle semble devoir mourir en peu d'heures : il suffit alors de lui faire cette transfusion pour la guérir presque à coup sûr, et cela si rapidement que quelques jours après elle ne paraît pas avoir été malade. »

En consultant les travaux ultérieurs des autres savants on se rend compte très facilement que :

BEHRING et KITASATO en trouvant les antitoxines dans le sang des animaux réfractaires à la toxine tétanique ont fait une grande découverte comme disait METCHNIKOFF devant le Congrès international de Moscou en 1897.

Mais en ce qui concerne le pouvoir du sérum, il est bien évident qu'ils exagéraient l'efficacité de l'antitoxine.

En effet, un peu plus tard, en mars 1891, TIZZANI et CATTANI en Italie, VAILLARD en France, confirment la propriété antitoxique et immunisante du sérum des animaux immunisés, mais ils nient la valeur thérapeutique de ce sérum, selon BEHRING, et en outre VAILLARD ajoute que l'immunité acquise par le sérum n'est pas durable, qu'elle diminue dès le quinzième jour et peut même disparaître complètement avec le temps.

RENN, en traitant chez l'homme deux cas de tétanos avec le sérum de lapins immunisés nie, lui aussi, l'action curative de

ce sérum ; ses malades avaient reçu de fortes doses d'un sérum très actif et avaient succombé cependant à un tétanos caractérisé.

KITASATO, en 1892, confirme enfin les faits précédents en expliquant que le tétanos survient toujours quand le sérum est injecté dans les douze à vingt-quatre heures qui suivent l'injection ; il est le plus souvent curable, mais parfois mortel.

ROUX et VAILLARD ont communiqué en 1893 un travail complet sur le tétanos et son poison dont on peut tirer les conclusions définitives suivantes :

1° Le pouvoir préventif et immuisant de sérum des lapins réfractaires au tétanos est indiscutable et que l'antitoxine se trouve en quantité appréciable dans ce sérum ;

2° Contrairement à l'assertion de BEHRING et KITASATO, l'immunité qui suit les injections d'antitoxine n'est pas durable et peut diminuer dès le quinzième jour pour disparaître au bout de quarante jours au plus tard ;

3° Quant à l'action curative et thérapeutique elle n'existe que si l'antitoxine est très active et si le tétanos a une marche lente et si le traitement est appliqué dès l'apparition des premiers symptômes.

En 1894, ROUX et YERSIN déclarèrent avoir réalisé l'obtention de l'antitoxine diphtérique et montrèrent son importance dans le traitement de la diphtérie.

Les antitoxines tétaniques et diphtériques sont les premières antitoxines connues et les mieux étudiées et ce n'est que plus tard qu'on a étudié les antitoxines botuliques et dysentériques ainsi qu'une foule d'autres anatoxines animales et végétales.

LES PRINCIPALES ANTITOXINES CONNUES

- A. L'antitoxine tétanique (BEHRING et KITASATO, 1890) ;
- B. L'antitoxine diphtérique (ROUX et YERSIN, 1894) ;
- C. L'antitoxine botulique (KEMPNER) ;
- D. L'antitoxine dysentérique (SCHIGA, VAILLARD et DOPFER) ;

E. L'antitoxine du vibron cholérique (RANSON, METALNIKOF, ROUX et SALIMBENI) ;

F. L'antitoxine du bacille pyocyanique (WASSERMANN) ;

G. L'antitoxine du charbon symptomatique (GRASSBERGER et SCHATTENFROH) ;

H. On a étudié aussi les antitoxines du venin de serpent, de l'araignée, des abeilles, des crapauds, de sérum d'anguille (CALMETTE, CAMUS, GLEY, TCHISTOVITCH, SACHS) ;

I. On connaît encore les antitoxines végétales : celle contre l'abrine, la ricine (ABEL, ROCKWOOD).

L'origine de l'antitoxine, sa nature et les causes de sa spécificité

On a beaucoup discuté, depuis la découverte de BEHRING et KITASATO, sur le lieu de la production des antitoxines. De multiples recherches expérimentales ont été faites pour élucider ce phénomène mystérieux de l'organisme. Les organes, les éléments cellulaires et les humeurs sont tour à tour supposés comme lieu de production de cet anticorps spécifique. Mais aujourd'hui, d'une façon très générale, aucune des théories émises n'a été complètement adoptées.

Dans l'étude de l'origine de l'antitoxine, il y a avant tout une grande difficulté à résoudre, c'est la spécificité rigoureuse de cet anticorps vis-à-vis de l'antigène mis en cause.

Les hypothèses émises jusqu'à ce jour par divers auteurs peuvent être groupées et résumées de la façon suivante :

1° L'antitoxine ne représente qu'une simple modification de la toxine ; elle n'est pas autre chose que la toxine elle-même, ou de groupement et radicaux provenant de la toxine, modifiée par l'organisme et transformée d'une façon dont nous échappe encore le mécanisme.

C'est une hypothèse très ancienne émise par H. BUCHNER dès

la découverte des antitoxines. C'est la théorie de l'identité de l'antigène et de l'anticorps.

Sous la pression d'objections qui paraissaient irréfutables à cette époque, cette hypothèse devait être rapidement rejetée ;

2° L'antitoxine n'a aucun rapport de filiation avec la toxine : elle est formée aux dépens des seuls matériaux de l'organisme sans participation d'éléments provenant des molécules de la toxine. C'est la théorie d'EHRlich.

EHRlich, pour expliquer alors les causes de spécificité de l'antitoxine, émettait l'hypothèse suivante :

« La nutrition cellulaire s'opère à l'aide de certains éléments dits « récepteurs », qui manifestent une forte affinité pour les substances alimentaires. Cette affinité des récepteurs se manifeste également pour les antigènes. Lorsque les récepteurs sont ainsi saturés par l'antigène, la cellule tend à les reproduire, mais selon une loi biologique générale cette reproduction se fait en excès ; elle dépasse le but, et les récepteurs libres déversés dans les humeurs constituent les anticorps. »

Cette théorie n'est plus admise généralement aujourd'hui ; elle est demeurée dans le domaine de l'hypothèse.

L'hypothèse de l'identité de l'antitoxine et de la toxine, éliminée d'abord par des objections paraissant très sérieuses, a été reprise récemment par divers auteurs suivant des explications différentes. Par exemple, d'après OSTROMUISLENOKII (1915), l'antitoxine ne serait que la globuline normale du sérum modifiée physiquement par l'adsorption de la toxine. Les globulines normales du sérum peuvent se combiner avec les toxines. Cette combinaison peut ensuite être dissociée par les acides, avec mise en liberté d'une antitoxine libre et spécifique.

HERTZFELD et KLINGER (1917), BOISSEVAIN (1922), SDRVOMYSOFF et KOOTROMINE (1923), VLES et REISS (1924) ont émis des hypothèses analogues.

Mais pour soutenir une hypothèse dans ce genre, il est plus logique de réfuter avant tout les objections faites, il y a quarante ans, à la théorie d'identité de l'antigène et de l'anticorps.

Ces objections, quoique combattues, dans certaines mesures, théoriquement par les partisans de la théorie de l'identité n'avaient jamais été réfutées expérimentalement avant la reprise par RAMON de l'hypothèse abandonnée.

Mais disons tout de suite que ce savant, en émettant et en soutenant l'hypothèse de l'identité, n'accepte pas la formule ancienne par trop simpliste qui considère l'antitoxine comme dérivant directement de la toxine par l'effet d'une simple réaction chimique. L'origine de l'antitoxine, d'après lui, paraît plus compliquée ;

3° Théorie physico-chimique de RAMON. « L'antitoxine et les anticorps en général trouveraient leur origine dans la formation de complexes humoraux constitués de matériaux provenant de l'organisme et d'éléments tirés de l'antigène spécifique, cela par un processus physico-chimique dans le cas des antitoxines, plus simplement physique pour les autres anticorps. »

Les objections faites à l'hypothèse de l'antitoxine dérivant de la toxine peuvent se grouper comme suit :

1° L'antitoxine spécifique ne peut provenir de la toxine, car on peut, dans le cas de la diphtérie par exemple, la déceler en quantités plus ou moins abondantes chez certains chevaux, neufs de toute injection d'antigène spécifique. Or, il est démontré aujourd'hui que la présence normale de l'antitoxine diphtérique dans le sang des chevaux neufs, décelée en premier lieu par ROUX et MARTIN, avant toute immunisation active artificielle, trouve son origine dans des contacts répétés avec le bacille de LOEFFLER à l'occasion d'infections légères, le plus souvent inapparentes ;

2° L'antitoxine ne peut dériver de la toxine, étant donné que chez l'animal hyperimmunisé, le pouvoir antitoxique du sang peut remonter après des saignées copieuses, sans qu'il soit nécessaire de réinjecter l'antigène spécifique ou bien simplement par une injection d'une substance non spécifique comme la pilocarpine (SALOMONSEN et MADSEN 1898) par exemple.

Or, à l'aide de la réaction de floculation et par de multiples dosages G. RAMON a montré qu'en réalité, lorsque des saignées copieuses sont pratiquées suffisamment longtemps après la dernière injection d'antigène diphtérique, le pouvoir antitoxique du sérum ne fait que baisser : « Il ne remonte que si l'on injecte à nouveau à l'animal l'antigène spécifique. C'est ainsi que le sérum d'un cheval hyperimmunisé, chez qui l'on a cessé toute injection d'antigène, renfermant 330 unités au cc. pour le sérum de la saignée initiale ne contient plus après la 23^e saignée que 58 unités seulement au centimètre cube.

Quant à l'influence de la pilocarpine, le même auteur, en collaboration avec DESCOMBEY et VALOT a montré expérimentalement « qu'il n'a pas d'action physiologique de cet alcaloïde sur la sécrétion de l'antitoxine ; il s'agit d'une action indirecte qui entraîne une augmentation toute provisoire de l'antitoxine ».

En effet, si le taux d'antitoxine s'augmente dans les heures qui suivent l'injection de pilocarpine, ceci est dû à ce que sous l'influence de cette substance les sécrétions sudorales, salivaires et intestinales sont considérablement accrues : en l'espace de quelques heures, l'animal perd 7 à 8 litres de liquide ; il y a de ce fait deshydratation du sang et concentration momentanée des protéines et de l'antitoxine sanguine. Par la suite, l'animal, pour les besoins de sa circulation, reprend de l'eau dans son intestin, le sang se rehydrate et l'antitoxine est ramenée rapidement à son taux primitif et, même, légèrement au-dessous.

De même les substances non spécifiques comme le tapioca (RAMON), les sels de manganèse (WALBUM), etc., etc., qui, ajoutés à la toxine (tapioca) ou injectés dans la veine d'un cheval soumis d'autre part à l'immunisation antidiphtérique (sels de manganèse) provoquent une augmentation anormale du taux de l'antitoxine se montrent inefficaces si on les injecte toutes seules en l'absence de l'antigène spécifique. De sorte que à aucun moment on n'a constaté de relèvement de la valeur

antitoxique des sérums des animaux sous l'influence de ces injections de ces substances seules.

Pour qu'il y ait réellement production, augmentation de production de l'antitoxine, l'antigène spécifique doit toujours être présent.

Les substances non spécifiques, comme nous allons le voir en détail à la fin de la deuxième partie de cet exposé, sont seulement capables d'aider l'organisme à tirer un meilleur parti de l'antigène spécifique qui lui est offert avec elles.

De tout ceci, il ressort d'après RAMON que « ce n'est pas de son propre fonds exclusivement que l'organisme peut tirer tous les matériaux nécessaires à la production de l'antitoxine, il lui faut d'autres ressources qui ne peuvent lui être fournies que par l'antigène spécifique, aliment indispensable à cette production. »

« Pénétrant dans l'organisme, l'antigène subit sans doute une modification (vraisemblablement par des ferments cellulaires, humoraux, etc.) une dissociation, plus ou moins rapide et d'intensité variable ; lui-même est la cause de troubles plus ou moins profonds dans l'équilibre humoral de cet organisme. C'est ainsi par exemple que, chez le cheval, au cours de l'hyperimmunisation vis-à-vis de l'intoxication diphtérique, il se produit un changement très accusé dans les proportions des protéines sériques et en particulier des globulines. A la faveur de cette action mutuelle de l'antigène et de l'organisme, à la faveur de ce déséquilibre humoral, apparaît, grâce à un processus physico-chimique, le « complexe antitoxine » à la formation duquel prennent part les matériaux fournis par l'organisme et les éléments issus de l'antigène, ceux-ci transmettant au complexe la spécificité. Cette spécificité, si absolue dans le cas des antitoxines diphtérique et tétanique, qu'on a tenté d'éclaircir de multiples façons, sans y parvenir, ne saurait mieux s'expliquer que par la persistance dans le « complexe antitoxine » d'un « noyau », d'un « radical » chimique provenant de l'antigène spécifique. »

LE SIÈGE ET LA SITUATION DE L'ANTITOXINE

Si l'origine et le lieu de production de l'antitoxine n'est pas encore bien connu, ce n'est pas de même en ce qui concerne le siège et la situation de l'antitoxine.

Dès la découverte de l'antitoxine on savait que la substance antitoxique existe surtout dans le sang et plus exactement dans le sérum et dans la lymphe circulante. Le caillot n'en renferme pas.

Elle est mobilisable grâce à ces éléments et c'est ainsi qu'un sinapisme appliqué au cheval fait baisser le taux des antitoxines du sang, au profit de la lymphe exsudée au niveau du sinapisme, ou au niveau de l'œdème provoqué par l'injection sous-cutanée de la toxine (RAMON).

Toutes les humeurs et d'autres liquides de l'organisme autres que le sang, renferment de l'antitoxine en quantité plus ou moins grande mais toujours inférieure à celle du sang.

L'urine, la salive et l'humeur aqueuse renferment des traces de l'antitoxine.

Le lait en particulier est riche en antitoxine et agit comme le sérum (EHRlich).

Les organes autres que le sang, le foie, la rate, les capsules surrénales, le pancréas, les glandes salivaires, le thymus détruisent *in vitro* la toxine.

Le liquide céphalo-rachidien ne contient par rapport au sang qu'une proportion infime d'antitoxine. Le suc musculaire n'en renferme pas.

La substance antitoxique s'élimine constamment par les reins et aussi par le lait chez les femelles (ROUX et VAILLARD).

L'antitoxine passe à travers le placenta et se transmet passivement de la mère à l'enfant. L'antigène ne paraît pas pouvoir être transmis dans ces conditions (RAMON, NATTAN-LARRIER et E. GRASSET).

Chez la poule, l'antitoxine spécifique passe facilement du

milieu sanguin de l'animal dans le vitellus de l'œuf et non dans l'albumine. De plus l'antitoxine que recèle ainsi le jaune d'œuf fécondé se trouve intégralement dans le sang du poussin sorti de cet œuf (RAMON).

LES ANTIGÈNES GÉNÉRATEURS D'ANTITOXINE

APERÇU GENERAL DES DONNÉES CLASSIQUES SUR LA TOXINE

Il est établi aujourd'hui d'une façon formelle que certains agents pathogènes, le bacille diphtérique et le bacille tétanique en particulier, ne pullulent pas dans les organes des malades infectés par ces microbes et l'on arrive rarement à les trouver dans les lésions alors que cependant ils déterminent des symptômes très graves et parfois mortels.

On s'expliquait mal, il y a quarante ans, avant la découverte de la toxine diphtérique par MM. Roux et Yersin comment une culture aussi restreinte de ces microbes localisés dans des endroits très éloignés des organes essentiels, pouvait déterminer les symptômes d'une maladie mortelle.

LOEFFLER, au cours de ses recherches sur la diphtérie, avait soupçonné l'existence d'un poison diphtérique, en admettant ce même principe que le bacille ne se trouve pas dans la lésion locale, et il avait été ainsi conduit à penser que l'action nocive pourrait être due à une substance toxique secrétée par le bacille, mais ce n'était qu'une simple hypothèse.

La découverte de la toxine diphtérique, par MM. Roux et Yersin en 1887, après de longues et belles recherches, amène la solution parfaite d'un problème si mystérieux de la vie microbienne et aujourd'hui, grâce à leurs travaux et à leur belle découverte, on sait que le bacille diphtérique secrète au

La première toxine soluble est celle du cocco-bacille du choléra de poule découverte par PASTEUR en 1880.

foyer de sa végétation un poison très actif qui se répand dans l'organisme par diffusion.

Ce poison est aujourd'hui bien connu sous le nom de toxine diphtérique et il suffit pour se rendre compte de son existence de le rechercher dans les milieux nutritifs où le microbe a vécu.

Des travaux de MM. ROUX et YERSIN, il résulte une orientation nouvelle pour les recherches sur les produits toxiques microbiens et les maladies toxi-infectueuses.

En 1889, KITASATO fait connaître les conditions de l'isolement parfait du bacille de tétanos.

En 1890, KNUD et FABER, orientés par ces travaux, ont fait connaître la toxine tétanique et, bien qu'opérant sur des produits impurs, ils parviennent à produire le tétanos par l'inoculation d'une trace de culture filtrée sur porcelaine.

En effet, si on filtre sur des bougies de porcelaine, une culture pure de bacille diphtérique ou tétanique en bouillon datant de 18 à 20 jours, on obtient un liquide privé de tout germe, dégageant une odeur caractéristique, à réaction franchement alcaline, et d'une toxicité considérable pour les animaux.

La dose active de ce liquide peut être infinitésimale ; par exemple pour le tétanos un cent millième de centimètre cube donne le tétanos aux souris.

Les travaux et recherches sur la nature et les propriétés des toxines microbiennes, sont nombreux et durant ces quarante dernières années à dater de la découverte de la toxine diphtérique un nombre considérable de publications ont apporté la lumière sur le mystère des maladies à toxi-infection.

Ces recherches, quoique bien avancées, ne sont pas encore terminées, il y a encore des points obscurs sur la connaissance des toxines, sur leurs propriétés et leur composition.

Dès 1888, MM. ROUX et YERSIN ont communiqué une étude complète sur la diphtérie et la toxine diphtérique, après quoi des travaux de BRIEGER-FRANKEL, WASSERMANN-PROSKAUER, BRIEGER-BOER, BRIEGER-WASSERMANN, KOSSEL, GAMALEIA, GUI-

NOCHET, OUTCHINSKY, ELIERLISEB, MADSEN, CRUVEILHIER, sont venus confirmer les recherches des savants français.

Plus tard, les travaux de KITASATO, KNUD, FABER, VAILLARD-VINCENT, VAILLARD-ROUGET, COURMONT, DOYEN, sur le tétanos aboutirent à définir les propriétés de la toxine tétanique.

Il en résulte, d'après ces travaux, que la toxine tétanique est exactement comparable à la toxine diphtérique et que, en outre, il y a des analogies frappantes entre les toxines microbiennes, les diastases et les venins.

Toutes les substances toxiques ne sont pas susceptibles de provoquer l'apparition d'antitoxine chez l'animal,

Par exemple avec la tuberculine les hémolysines et d'autres poisons d'origine microbienne, malgré leur nocivité, on n'a pu jamais obtenir d'antitoxines vraies capables de neutraliser les poisons correspondants.

Les principales toxines microbiennes, végétales et animales susceptibles d'engendrer de l'antitoxine spécifique sont :

a) La toxine diphtérique (ROUX et YERSIN), toxique pour presque toutes les espèces animales. La toxine secrétée par les différentes souches de bacilles diphtériques se différencie énormément au point de vue de la toxicité. La souche qui donne la toxine plus nocive est celle secrétée par le bacille isolé par WILLIAMS et PARK, connu sous le nom de Bacille Am 7, qui tue le cobaye à 1/500, 1/800 et même 1/1000 de centimètre cube.

b) La toxine tétanique (KNUD-FABER), toxique pour tous les animaux de laboratoire. Pour la poule il faut injecter une dose très élevée. La dose mortelle pour le cobaye, espèce très sensible et l'animal de choix, est de 1/5.000 à 1/10.000 de centimètre cube et bien davantage.

c) La toxine botulique (VAN ERMENGEM) qui est la toxine la plus nocive pour l'homme et pour les animaux. 1/50.000 de centimètre cube suffit pour tuer le cobaye.

Il y a encore les autres toxines microbiennes : celle du charbon symptomatique, celle du bacille dysentérique, celle du

vibron cholérique, les toxines des microbes de la gangrène gazeuse qui sont plus ou moins étudiées.

De toutes ces toxines, les mieux étudiées sont celles de la diphtérie et du tétanos. Ce sont elles que nous viserons spécialement quand nous parlerons, dans nos travaux, de la toxine.

d) Les venins de serpent agissent comme les toxines microbiennes.

e) Les poisons végétaux : l'abrine, la ricine, la phaline sont également comparables aux toxines microbiennes.

QUELQUES NOTIONS GÉNÉRALES SUR LA NATURE ET LES PROPRIÉTÉS DES TOXINES MICROBIENNES

Après la filtration du bouillon de culture, le poison diphtérique ou tétanique est un liquide limpide à odeur caractéristique ; on n'est pas encore fixé sur la nature de la substance toxique.

Sa nature se rapproche de celle des diastases (ROUX et YERSIN), d'une toxi-albumine (BRIEGER et FRANKEL) ou enfin il s'agirait d'une nucléo-albumine (GAMALEIA).

Comme les diastases, les toxines sont très sensibles à l'action de la chaleur ; elles se détruisent à une température peu élevée : chauffées pendant deux heures à la température de 65° elles ne sont plus toxiques, la toxine est détruite par l'action de l'air et de la lumière, celle-ci n'exerce aucune influence en l'absence de l'air.

Comme les diastases pancréatiques, l'activité des toxines diminue en présence des acides.

Les toxines ne donnent aucun résultat positif avec les réactifs des alcaloïdes (BRIEGER et FRANKEL) ; elles ne présentent aucun des attributs propres aux ptomaïnes ni aux alcaloïdes.

Les antiseptiques oxydants : permanganate de potasse 1/100, chlorure d'or à 1/100, hypochlorique alcalins, acide chromi-

que, trichlorure d'iode, diminuent la toxicité et même la détruisent complètement.

Le formol a une action particulière très marquée sur la toxine. Les travaux de M. RAMON (1922-23) aboutissent par la mise en valeur de l'action ménagée de la chaleur et du formol sur la toxine à la préparation de l'anatoxine.

Nous reviendrons plus loin sur ce sujet que nous traiterons avec plus de détails, vu la grande importance des travaux concernant l'anatoxine.

La toxine se précipite par l'alcool et le précipité albumineux renferme toute la substance toxique.

Mais cette précipitation par l'alcool affaiblit notablement l'activité des toxines comme elle le fait avec les diastases (ROUX et YERSIN).

La toxine est entraînée par certains précipités minéraux qui se forment dans le liquide ; le précipité de phosphate tribasique de chaux par exemple.

Les toxines sont très solubles dans l'eau, ne se précipite pas par l'ébullition (BRIEGER et FRANKEL).

Les toxines ont la propriété d'adhérer certains précipités que l'on produit dans le liquide dans lequel elles sont contenues ; les précipitants salins : phosphates de chaux, chlorure de calcium, sont les meilleurs pour entraîner la toxine (ROUX et YERSIN).

Comme les venins, les toxines agissent à des doses impondérables et n'exercent aucun effet lorsqu'on les introduit par les voies digestives ; la toxine botulique est la seule toxine microbienne qui agit par la voie digestive.

CRUVELHIER croit qu'à côté de la toxine ou des toxines diffusibles, il existe une endoxine diphtérique très adhérente au corps bacillaire à l'égard de laquelle l'antitoxine ordinaire n'a pas d'action.

D'après EHRLICH, il y a deux sortes de substance dans le produit toxique sécrété par les microbes : *toxone* et *toxine*. Les deux groupes ont une virulence bien différente ; la toxone est

très peu toxique ou sa toxicité est même nulle. Toute la toxicité vient de la toxine.

Dans les bouillons filtrés, au contact de l'oxygène, les toxines se transforment en toxoïdes qui fixent aussi de l'antitoxine mais ne présentent pas de pouvoir pathogène.

D'après la théorie d'EHRlich, les toxines sont composées :

a) D'un groupe toxophore susceptible de s'unir à la cellule pour constituer un corps toxique ;

b) D'un groupe haptophore, susceptible de s'unir aux anti-corps.

Pour EHRlich, l'immunité serait due à la libération du groupement haptophore des toxines, groupement qui jouerait un rôle d'appel des antitoxines.

En chauffant les toxines à 50° ou en laissant vieillir simplement à température de laboratoire, EHRlich avait constaté qu'elles perdaient leur propriété toxique (groupe toxophore), mais qu'elles étaient encore capables d'engendrer l'immunité et de s'unir aux antitoxines, comme il s'agit d'une toxine pure et récemment préparée.

MADSEN croyait tout d'abord à l'existence des toxones. Les paralysies tardives qui paraissaient à la suite de l'intoxication diphtérique étaient dues, en particulier, d'après lui, à ces substances.

Le même auteur avec DREYER auraient pu conférer au lapin, avec les toxones, certaines résistances à l'intoxication, mais sans production notable d'anticorps. Plus tard, il a renoncé à l'existence de ces substances, de sorte qu'aujourd'hui, d'après lui, les toxones d'EHRlich n'existent pas.

La seule substance qu'il ait acceptée est la toxine ; la toxoïde ne serait qu'une autre forme de la toxine puisqu'elle a conservé les deux fonctions les plus importantes : la fonction antigène et la fonction neutralisante vis-à-vis de l'antitoxine.

Pour SCHMIDT, la différence entre la toxine et la toxoïde est du même ordre que celle existant entre le phosphore jaune et la variation rouge de la même matière. La première variation

est toxique tandis que la deuxième ne l'est pas, mais toutes les deux donnent les mêmes composés chimiques (P2 O5 par exemple).

Les toxoïdes se laissent transformer par un processus spécial en toxine (WALBUM), de sorte que le processus toxine $\longrightarrow$ toxoïde doit être écrit toxine $\rightleftharpoons$ toxoïde (H. SCHMIDT et SCHOLZ).

Il faut remarquer d'ailleurs que ni EHRLICH ni d'autres expérimentateurs, malgré de longues recherches, n'ont pas montré définitivement l'existence des toxones ; elles ne sont que des substances hypothétiques et, d'après un grand nombre de savants (S. SCHMIDT, RAMON, etc., etc.), il n'y a aucune raison d'admettre leur existence.

Dans tous les cas, on doit concevoir, aujourd'hui, une toxine microbienne comme pourvue d'une double propriété, à savoir :

- 1° Une propriété toxique ;
- 2° Une propriété antigène, que l'on reconnaît par deux moyens :

a) Incorporée dans l'organisme, la toxine a la propriété d'y faire apparaître des antitoxines ;

b) Mise en présence de l'antitoxine, elle a la propriété de fixer de l'antitoxine et de la neutraliser.

Le pouvoir antigène de la toxine se révèle par l'atténuation du pouvoir nocif de la toxine, et cela par divers moyens, vieillissement ou chaleur (EHRLICH) ; savons (H. VINCENT), formol et chaleur (RAMON). Nous reviendrons plus tard, en détail, sur la révélation du pouvoir antigène à propos de l'anatoxine diphthérique.

Depuis les travaux de M. RAMON (1922), on connaît une autre propriété beaucoup plus importante de la toxine microbienne : c'est la propriété floculante de la toxine vis-à-vis de l'antitoxine.

Cette propriété de la toxine est strictement spécifique ; elle ne se montre qu'avec l'antitoxine correspondante. C'est une

propriété très précieuse qu'on emploie depuis, couramment, d'après le principe de RAMON, dans tous les laboratoires de sérothérapie du monde pour le dosage *in-vitro* du sérum.

Nous allons voir en détail, dans le chapitre consacré à ce sujet, comment et d'après quel principe on arrive à doser un sérum par la méthode de floculation. Voyons pour le moment en quoi consiste la floculation. Dans une série de tubes à essais contenant chacun une quantité fixe de la toxine récemment filtrée (20 cc. par exemple), on ajoute des quantités décroissantes d'un sérum antitoxique correspondant (2 cc., 1,8, 1,6, 1,4, 1 cc., 0,8, 0,6, 0,4, etc., etc.). On agite soigneusement les tubes pour bien mélanger la toxine et le sérum, puis on les laisse au repos soit à la température de laboratoire, soit à l'étuve à 37°. Au bout d'un certain temps, qui varie avec la température (à l'étude à 37° la floculation apparaît plus vite qu'à la température de laboratoire, au bain-marie à 45° on l'aura plus vite), on remarque d'abord dans certains des mélanges une opalescence qui, dans l'un d'eux, se transforme bientôt en floculation ; c'est la floculation initiale. Cette floculation initiale indique la saturation et la neutralisation mutuelle de la toxine et du sérum contenus dans ce tube. C'est à ce phénomène spécifique et visible à l'œil nu que l'on a donné le nom de floculation.

Le pouvoir floculant et le pouvoir toxique d'une toxine se correspondent pendant toute la durée de l'élaboration de la toxine au sein de la culture (jusqu'au huitième jour), de sorte que pendant ce temps on peut bien titrer, et cela d'une manière aussi précise que le titrage *in-vivo*, le pouvoir toxique par la floculation.

A partir du huitième jour de la culture, le pouvoir toxique s'abaisse tandis que le pouvoir floculant ne change pas du tout ; de sorte que par la suite et pour une toxine qui n'est pas récente, la floculation ne montre plus le pouvoir nocif actuel, mais le pouvoir toxique maxima qui a été atteint par la toxine au cours de la culture (RAMON).

Le pouvoir flocculant d'une toxine est très stable par contre le pouvoir toxique est particulièrement instable de sorte qu'on peut arriver à débarrasser complètement une toxine de sa toxicité sans changer son pouvoir flocculant.

GLENNY a proposé de désigner par Lf (pourvoir flocculant), la quantité de toxine qui, mélangée à une unité d'antitoxine, donne une floculation.

ANATOXINE ET SA PUISSANCE PRODUCTRICE D'ANTITOXINE

Nous avons vu dans le chapitre consacré à la toxine microbienne que la toxine microbienne est très sensible à l'action de la chaleur, au vieillissement, ainsi qu'à un grand nombre d'agents chimiques, physiques et biologiques, et que la toxine ainsi modifiée par ces agents ne peut être atténuée dans sa toxicité et employée, dans une certaine mesure comme vaccin antitoxique.

D'un autre côté, nous avons vu aussi, en ce qui concerne l'antitoxine, que la toxine incorporée dans l'organisme de certains animaux et grâce à certaines précautions, peut immuniser cet organisme, le protéger vis-à-vis de la toxi-infection naturelle ou expérimentale.

Et enfin, nous allons voir que grâce aux efforts de MM. Roux et de ses collaborateurs la préparation des sérums antitoxiques fut réalisée dès 1890 et les sérums furent employés largement dans le traitement de la diphtérie et la prévention du tétanos.

Mais si l'immunisation passive de l'homme, réalisée par l'emploi du sérum, est devenue en peu de temps universellement connue, par contre, l'immunisation active reste à mi-chemin et les efforts faits pendant plus de 30 ans par un grand nombre de savants, pour appliquer cette méthode de vaccination à l'homme, n'ont donné aucun résultat définitif.

La difficulté sérieuse était ici à ce que la toxine microbienne tout en possédant des propriétés immunisantes est très nocive et son emploi, même avec des précautions nécessaires, exposait à de grands dangers même pour les animaux immunisés, producteurs de sérum (mort des chevaux au cours de leur hyper-

immunisation en vue de la production de sérum antitoxique).

Mais, depuis les mémorables travaux de ROUX et YERSIN sur la toxine diphtérique, on savait que la stabilité de diverses fonctions de la toxine est bien différente et que la fonction toxique en particulier est la plu instable.

EHRLICH avait montré qu'une toxine affaiblie par la chaleur ou par vieillissement conserve dans une certaine mesure son pouvoir immunisant.

Plus tard, BORDET avait constaté que la qualité antigène est sans rapport avec le pouvoir toxique : « L'organisme qui répond à l'injection de poison diphtérique ou tétanique, disait-il, ne vise pas à proprement parler le caractère dangereux de ces substances. Ils se comportent à leur égard comme s'il s'agissait d'une albumine quelconque (caséine, stroma des globules rouges). Il se produit un anticorps.

« L'abolition de ses propriétés spécifiques n'est pas le but que l'organisme s'est assigné, la toxine est susceptible de contracter avec l'anticorps qu'elle a fait apparaître. »

Il ressort en un mot, de tout ceci, que le pouvoir antigène d'une toxine ne dépend pas de son pouvoir toxique ; ces deux propriétés essentielles de la toxine ne sont pas liées ensemble d'une manière formelle et absolue.

Dès lors l'idéal tendant à réaliser un vrai vaccin antitoxique efficace et inoffensif consistait à diminuer considérablement la nocuité ou, mieux, l'abolir complètement sans toucher son pouvoir immunisant.

A la recherche d'un vrai vaccin antitoxique

Peu après la découverte de la toxine diphtérique, un certain nombre de savants, ROUX et YERSIN, ROUX et VAILLANT, BEHRING, LOWENSTEIN, MARTIN, etc., etc., avait constaté que les toxines affaiblies par certains agents physiques ou chimiques, conservent, dans une certaine mesure, leur pouvoir immunisant.

BÉHRING et KITASATO, pour vacciner les lapins contre la toxine tétanique, utilisaient le trichlorure d'iode. ROUX et VAILLARD employaient la solution iodo-iodurée. BEHRING et WASSERMANN ont vu que l'extrait de thymus joue le même rôle que l'iode vis-à-vis de la toxine. HERLICH, en chauffant les toxines à 50° ou simplement en les laissant vieillir à la température de laboratoire, avait vu qu'elles perdaient leur propriété toxique, mais qu'elles étaient susceptibles d'immuniser et de s'unir aux antitoxines dans la même proportion que la toxine pure récemment préparée. C'est à cette substance qu'il donna le nom de toxoïde.

MADSEN, en analysant divers bouillons diphtériques, en trouva un qui, après un certain temps, avait perdu plus de 75 % de sa nocuité primitive et pourtant son pouvoir neutralisant existait intégralement et il suggère par la suite que la totalité du pouvoir toxique d'un poison peut sans doute être abolie sans diminution appréciable de la propriété neutralisante vis-à-vis de la toxine.

DZIERZGOWSKI, en 1902, s'était vacciné lui-même à l'aide de toxine diphtérique non modifiée.

VALLÉE et L. BAZY, au cours de la dernière guerre, appliquèrent la toxine iodée à la vaccination de l'homme contre le tétanos.

Th. SMITH, en 1906, avait l'idée d'ajouter à la toxine diphtérique une certaine proportion de sérum antidiphtérique pour diminuer la toxicité de la toxine.

LOWENSTEIN, en 1909, avait remarqué que le formol affaiblit le pouvoir toxique de la toxine tétanique en respectant son

(1) Nombreux sont les agents chimiques, physiques ou biologiques anciennement ou récemment utilisés, dans le but d'atténuer, annihiler la nocuité de poisons microbiens. Mais ces moyens sont employés, dans un grand nombre de cas, par des expérimentateurs plus soucieux de la disparition de cette nocuité que de la conservation du pouvoir antigène et immunisant. Nous n'avons pas trouvé utile de citer ici toutes ces recherches et le nom de leurs auteurs.

pouvoir antigène, et il utilisa cette toxine formolée au début de l'immunisation de chevaux producteurs de sérum. Mais il essaya en vain de débarrasser complètement la toxine de sa toxicité. Les essais entrepris chez l'homme n'ont pas donné de résultats probants. Il prétendait d'ailleurs que la toxine diphtérique se prête mal à l'action du formol.

II. VINCENT, en 1907, a montré l'action de la bile et de ces éléments constituant sur la toxine tétanique. D'après cet auteur, l'oléomargarate de soude a également une action atténuante très marquée sur la toxine.

Mis en présence de la toxine pendant un temps déterminé et dans certaines conditions de concentration et de température, la toxine devient complètement atoxique et vaccinante.

Plus tard, en 1926, le même auteur a montré l'action du palmitate de sodium sur les toxines diphtérique, tétanique, dysentérique, colibacillaire, etc., etc., qu'il rendait atoxiques et vaccinales. Le cobaye supporte par exemple plus de 600 doses mortelles de toxine tétanique et le lapin de 2 kgr., 600 à 12.000 doses mortelles.

VINCENT a proposé d'appeler ces toxines atténuées sous le nom cryptotoxines.

Mais les toxines ainsi modifiées par la palmitate de sodium ne sont pas détruites ; traitées par l'acide chlorhydrique avec précautions, ces toxines modifiées déterminent de nouveau chez le jeune cobaye un tétanos léger (s'il s'agit de la toxine tétanique).

Il s'agit donc d'un complexe toxine-savon réversible et il diffère beaucoup à ce point de vue des toxoïdes qui étaient plutôt des substances stabilisées.

A propos de ce complexe toxine-savon, il y a lieu de rappeler que les travaux récents de VELLUZ montrent que le chimisme d'une micelle diastatique n'était pas modifiée par l'absorption d'un savon, mais seulement par la précipitation à la surface de la micelle de l'acide gras correspondant, à la condition que cet acide soit insoluble dans l'eau.

SEDALLIAN et VELLUZ ont constaté qu'un mécanisme analogue semblait intervenir dans l'atténuation des toxines microbiennes par le savon : la micelle toxique ayant absorbé *in-vitro* un savon, ils se formerait à sa surface dans l'être vivant à l'intérieur des cellules (milieu acide), un film d'acide gras insoluble conférant à son support colloïdal l'inertie réactionnelle.

BEHRING, en 1913, proposa l'emploi d'un mélange de toxine-antitoxine. Le principe consistait à neutraliser incomplètement la toxine à l'aide de l'antitoxine diphtérique en lui laissant une très légère toxicité. Car d'après lui seule les mélanges contenant un excès de toxine peuvent conduire à l'immunité active.

Ces mélanges T + A (toxine + antitoxine) expérimentés en Allemagne puis aux Etats-Unis ont fourni certains résultats encourageants. Mais la difficulté de la préparation et de la mise au point d'un tel mélange, les accidents regrettables qu'il a causés, et la lenteur de la réaction, et surtout sa dissociation possible sous des influences diverses étaient des raisons de défaillance de ce vaccin qui lui enlevèrent beaucoup de valeur pratique.

MORGENROTH et ses collaborateurs ont constaté en effet que la dissociation de ce complexe A + T est possible dans une certaine mesure et ils ont pu arriver à augmenter la toxicité d'un mélange T + A primitivement inoffensif pour un animal donné.

Mais c'est surtout M. RAMON qui a montré d'une façon bien nette et très démonstrative la possibilité de cette dissociation et récupération de l'un de ces éléments, par exemple de l'antitoxine utilisée pour former le complexe A + T.

La combinaison toxine-antitoxine est donc une combinaison tout à fait instable et on se rend compte facilement combien cette dissociation qui peut avoir lieu sous les diverses influences physique, chimique et biologique diminue la valeur d'un vaccin antitoxique et le rend dangereux dans le cas que la toxine dissociée amène plutôt une issue fatale que de vacciner l'organisme animal.

L'emploi de formol (aldehyde formique) dans le but de diminuer la nocivité de la toxine commence avec les travaux de LOWENSTEIN (1907). Nous avons vu que cet auteur essaya, mais en vain, de débarrasser complètement la toxine de sa toxicité.

GLENNY et HOPKINS, en 1921, reprirent l'idée de LOWENSTEIN et, en ajoutant à une toxine diphtérique du formol en raison de 0,1 %, et en laissant cette toxine formolée pendant quatre semaines à la température de 37°, ils ont constaté une atténuation prononcée de la toxine sans que le pouvoir antigène ait trop souffert.

En 1923, ils vaccinèrent avec succès les animaux avec la toxine ainsi affaiblie par le formol et essayèrent de préparer un vaccin constitué par un mélange de toxine modifiée par le formol, et l'antitoxine.

C'est M. RAMON qui, en 1922-1923, et après de longues et belles recherches, arriva à mettre au point l'action ménagée de la chaleur et du formol dans la préparation d'un vrai vaccin antidiphtérique qu'il proposa d'appeler anatoxine diphtérique.

L'anatoxine diphtérique

Nous avons vu que toutes les tentatives faites pour réaliser la préparation d'un vrai vaccin antitoxique et surtout antidiphtérique ont échoué les unes après les autres et les 20 ans de travaux d'un grand nombre de savants n'avaient finalement comme résultat qu'une certaine notion vague sur l'atténuation de la toxine par le formol ou par le mélange T + A.

Aujourd'hui qu'on a, grâce aux travaux et à la belle découverte de M. RAMON, entre les mains et au profit de tout le monde de vrais vaccins antitoxiques : anatoxine diphtérique, tétanique, dysentérique, etc., etc., on se rend compte très facilement, entre autre, la grande raison pour laquelle toutes les tentatives avaient échoué et avaient été abandonnées peu après leur découverte.

C'est que, malgré les travaux de certains auteurs (ROUX, BORDET, etc., etc.); on ne savait pas grand chose en ce qui concerne les rapports qui existent entre le pouvoir toxique et le pouvoir antigène d'une toxine. Et malgré les résultats encourageants qu'on obtenait avec une toxine plus ou moins débarrassée de sa toxicité, on ne pouvait pas (avant les travaux de RAMON) se rendre compte qu'une toxine débarrassée de toute sa nocivité est capable d'engendrer une immunité et une production d'antitoxine aussi bien qu'une toxine non modifiée. On croyait toujours que pour engendrer une immunité solide, la toxine modifiée et utilisée comme vaccin devait avoir une légère toxicité, c'est-à-dire être, dans une certaine mesure, encore toxique.

C'est ainsi que EHRLICH, lui-même, prétendait qu'avec ses toxoïdes il n'obtenait qu'un « fondement d'immunité », (*grundimmunität*) mais dès qu'il s'agit de production d'antitoxine, il faut avoir recours au poison non modifié (un *modifizierter Gifte*).

C'est surtout sous l'influence de ses idées et d'école allemande en général que pour obtenir le maximum d'antitoxine on se mit à injecter le plus possible de doses mortelles. « La course aux unités a entraîné la course aux doses mortelles ».

Carl BRÜCK, s'inspirant des mêmes conceptions d'EHRLICH, a fait connaître que l'apparition de l'antitoxine exige une excitation que seules peuvent provoquer les groupements toxophores de la toxine.

Ce sont les mêmes idées enfin qui guidèrent BEHRING dans la préparation des mélanges toxine-antitoxine. Ils instituaient sa méthode de vaccination en admettant que seuls les mélanges contenant un excès de toxine peuvent conduire à l'immunité active. Cependant, ROHMER et LÉVY, GASTER et TEN-BOHKO, HUNNIK et les autres auteurs qui employaient ses mélanges en guise de vaccin ou dans la production de l'antitoxine avaient eu à constater que l'immunité engendrée est d'autant moins grande que l'excédent de toxine libre est plus considérable.

Quoi qu'il en soit, nous allons voir qu'en opposition à toutes ces théories comment M. RAMON a montré « qu'une toxine diphtérique débarrassée de toute toxicité peut non seulement instaurer un fondement d'immunité mais qu'elle peut entraîner une production d'antitoxine très abondante et très rapide. »

En 1922, en effet, M. RAMON avait fait connaître, à la suite de la découverte du phénomène de la floculation (1) de la toxine et de l'antitoxine diphtérique, qu'une toxine diphtérique formolée à raison de 4 cc. de la solution commerciale d'aldéhydeformique, par litre et placée à l'étuve à 38-40° durant un mois, perd complètement sa propriété toxique sans que son pouvoir antigène soit touché. En outre, une toxine ainsi modifiée possède toute la valeur floculante de la toxine diphtérique d'où il est issu et il proposa d'appeler *anatoxine* (du grec *ana*, en arrière, en sens inverse), tout dérivé de la toxine répondant à cette définition quel que soit le moyen chimique ou physique mis en œuvre pour l'obtenir.

« Injectons donc sous la peau d'un certain nombre de cobaye 1 cc. d'une telle toxine qui tuait au moment de sa filtration un cobaye de 300 gr. à la dose de 1/800 de cc., et qui, après avoir subi par exemple l'action combinée de la chaleur et du formol, ne provoque plus chez l'animal d'expérience ni lésions locales, ni symptômes généraux précoces ou tardifs d'intoxication diphtérique, même à la dose de plusieurs centimètres cubes, mais flocule toujours en présence de la même quantité d'antitoxine (avec seulement un peu de retard dans l'apparition de la floculation).

15 à 18 jours après cette injection unique, les cobayes résistent déjà à plusieurs doses mortelles. Au bout d'un mois, ils supportent de 50 à 100 doses mortelles et plus. Si à ce moment, au lieu d'éprouver ainsi ces animaux nous leur injectons à nouveau 1 cc. d'anatoxine, ils résistent, 10 jours après cette

(1) Nous reviendrons en détail sur le phénomène de floculation dans le chapitre consacré au dosage des sérums antitoxiques.

seconde injection, à un millier et même à plusieurs milliers de doses mortelles pour des cobayes témoins.

Ces chiffres paraissent encore plus démonstratifs du degré de l'immunité atteinte lorsqu'on sait que l'immunisation antidiphthérique du cobaye est presque impossible avec le poison diphthérique simplement dilué, difficile avec l'ancienne méthode des mélanges toxine-liqueur de Gram, très lente et assez inconstante avec les mélanges toxine-antitoxine. »

C'est d'après ces termes que M. RAMON, pour la première fois dans sa communication à l'Académie des sciences, fait connaître sa belle découverte de l'anatoxine. Nous avons cru, avec raison peut-être, que rien ne peut mieux définir ce nouveau dérivé de la toxine que les mots venant directement de M. RAMON lui-même. Voilà pourquoi nous avons apporté ici à titre documentaire une partie de cette note historique de la séance du 3 décembre 1923 de l'Académie des sciences.

LES PROPRIÉTÉS DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE

L'inocuité absolue, le pouvoir flocculant, le pouvoir antigène, la résistance au chauffage, le pouvoir dissociant, l'irréversibilité, la conservation, voilà les propriétés essentielles de l'anatoxine diphthérique.

L'inocuité. — L'inocuité de l'anatoxine est absolue vis-à-vis des animaux les plus sensibles à la toxine. Prenons comme exemple le cobaye, animal de choix à cause de sa grande sensibilité à la moindre intoxication diphthérique. Injectons sous la peau de cet animal 5 cc. de l'anatoxine diphthérique dérivée directement d'une toxine tuant le cobaye à 1/1.000 de cc. avant de supporter l'action ménagée de la chaleur et du formol. Ce cobaye ainsi injecté de cette quantité d'anatoxine (dose équivalente à 5.000 doses mortelles de la toxine primitive non modifiée) reste indemne, il ne présente pas à la suite de l'injection ni œdème ni escarre au point d'injection ni

paralytic. En un mot, il se comporte comme un cobaye neuf et bien portant.

En multipliant ces expériences comme on a fait durant ces dernières années et dans tous les pays, on n'est jamais arrivé à observer la moindre toxicité de l'anatoxine.

Le pouvoir flocculant. — L'anatoxine diphtérique garde intacte ou presque la valeur flocculante de la toxine d'où elle est issue.

Prenons comme exemple la même toxine qui tuait le cobaye à 1/1.000 de cc. Cette toxine a une valeur antigène flocculante de douze unités, c'est-à-dire que, d'après le principe de la méthode de flocculation, 1 cc. de cette toxine est saturé par une quantité de sérum correspondant à 12 unités antitoxiques.

Si nous expérimentons sur la valeur flocculante de cette anatoxine nous constaterons que son pouvoir flocculant est intact (avec seulement un peu de retard dans l'apparition de la flocculation) (1).

Le pouvoir flocculant d'une anatoxine est en raison directe du pouvoir toxique de la toxine d'où elle est issue au moment de sa filtration. Autant cette toxine est toxique autant l'anatoxine est flocculante.

Pouvoir antigène. — Si on injecte sous la peau d'un cobaye 1 cc. d'anatoxine diphtérique, de bonne valeur antigénique (10 unités par exemple), on constatera après 15 jours que cet animal résiste déjà à plusieurs doses mortelles de la toxine diphtérique pour un cobaye neuf. Après un mois il supporte 50 doses mortelles. Si on injecte maintenant trois semaines après la première injection d'anatoxine une deuxième injection de même quantité, c'est-à-dire 1 cc., on constatera que l'animal supporte dix jours après cette deuxième injection, plusieurs centaines de doses mortelles. Cette démonstration

(1) Ce retard de la flocculation avec l'anatoxine n'a pas une grande importance au point de vue de la valeur antigène-intrinsèque de l'anatoxine, quand il n'a pas dépassé le double du temps de flocculation de la toxine dont elle dérive (RAMON).

montre bien la grande valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine, mais il est plus démonstratif encore de s'adresser au cheval, animal producteur du sérum en général chez qui le développement et la production d'antitoxine peut suivre plus commodément : Si on injecte à un cheval neuf 1 cc. puis, sept jours après cette première injection, une deuxième injection de 3 cc. de l'anatoxine diphtérique. Cinq jours après cette deuxième injection son sérum titre déjà 6 unités d'EHRlich au cc., c'est-à-dire « que 4 cc. d'anatoxine diphtérique ont provoqué en 12 jours dans l'organisme du cheval une telle formation d'antitoxine qu'un cc. du sérum de cet animal est capable de neutraliser 600 doses mortelles pour le cobaye ».

Le pouvoir antigène d'une anatoxine est en raison directe du pouvoir flocculant de même anatoxine. « Une anatoxine se montre d'autant plus immunisante qu'elle exige pour flocculer une plus grande quantité d'antitoxine. « Par exemple des deux anatoxines, flocculant en présence du même volume de sérum antidiphtérique, celle qui floccule le plus rapidement possède le pouvoir immunisant le plus élevé.

En envisageant ici le rapport qui existe entre le pouvoir flocculant d'une anatoxine et la nocivité de la toxine d'où elle est issue, on se rend compte facilement que pour avoir une anatoxine d'un pouvoir immunisant très élevé il faut s'adresser à la toxine la plus nocive à l'origine venant de la souche microbienne la plus toxigène.

« En réalité, l'anatoxine n'est pas seulement une toxine rendu inoffensive par l'action combinée du formol et de la chaleur ; elle comporte dans son principe, comme l'expérience ci-dessus vient le confirmer, outre la notion de l'inocuité, celle de la valeur antigène intrinsèque telle qu'elle nous est révélée par la réaction de la flocculation. »

La valeur antigène intrinsèque d'une anatoxine est exprimée en fonction de l'unité antitoxique, elle correspond à la quantité d'unités antitoxiques capable de faire apparaître la flocculation initiale dans 1 cc. d'anatoxine (RAMON).

Pouvoir dissociant de l'anatoxine. — L'anatoxine diphtérique ajoutée à un mélange neutre de toxine et d'antitoxine spécifique, dissocie ce mélange et, s'unissant à l'antitoxine, libère une portion plus ou moins grande de toxine, de telle sorte que le complexe toxine plus antitoxine plus anatoxine se montre toxique pour le cobaye auquel on l'injecte. Cette propriété est bien particulière à l'anatoxine.

« La dissociation des mélanges neutres et leur transformation en mélanges nocifs ne peuvent évidemment s'expliquer que par l'affinité spécifique de l'anatoxine pour l'antitoxine, cela même si l'antitoxine a déjà contracté ou est sur le point de contracter une union plus ou moins fragile avec la toxine du mélange » (RAMON).

Résistance au chauffage. — Une anatoxine résiste mieux à la chaleur qu'une toxine. « Une toxine chauffée à 65°-70° perd en grande partie sa toxicité et sa valeur antigène. Une anatoxine chauffée trois quarts d'heure à 65°-70° garde presque intégralement sa valeur antigène intrinsèque (RAMON).

Les nombreuses expériences faites sur le cobaye et les chevaux avec l'anatoxine chauffée (à 68° pendant une demi-heure) confirme cette résistance.

La stabilité et irréversibilité. — Une question très importante est celle de la stabilité de l'anatoxine dans ces propriétés principales : inocuité et valeur antigène intrinsèque. On a constaté aujourd'hui, d'après de nombreuses expériences, qu'une anatoxine âgée de 6 ans et gardée dans des conditions plus ou moins défavorables, n'a pas changé du tout ces propriétés principales.

De même l'irréversibilité de l'anatoxine est absolue et l'anatoxine ne risque pas de devenir toxique dans l'organisme vivant.

Jamais on n'a pu constater la transformation des anatoxines en toxines au cours des divers processus de purification utilisés. « Ces anatoxines purifiées jouissent d'une parfaite inocuité vis-à-vis de l'organisme animal; elles flocculent aussi

nettement et avec la même rapidité (quelquefois plus rapidement encore) que les anatoxines brutes du même titre » (S. SCHMIDT).

La puissance productrice d'antitoxine de l'anatoxine. — Nous avons montré déjà la haute valeur antigène intrinsèque d'une anatoxine dans la vaccination des animaux les plus sensibles tels les cobayes et cela sans aucune difficulté. Pour montrer d'une manière plus démonstrative la production de l'antitoxine grâce à l'anatoxine, prenons comme exemple le même cobaye que nous avons vacciné à l'aide d'un cc. de l'anatoxine diphtérique. Effectuons trois semaines après cette première injection une seconde injection de la même quantité d'anatoxine. La production de l'antitoxine dans le sang de cobayes ainsi traité est telle que son sérum neutralisera, dix jours après cette deuxième injection, plusieurs centaines de doses mortelles de la toxine pour un cobaye neuf. Si nous poursuivons encore nos injections de l'anatoxine à intervalles de plus en plus longs, nous constaterons finalement que la quantité de l'antitoxine augmente d'une manière très rapide au fur et à mesure qu'on renouvelle les injections d'anatoxine.

En se rappelant la grande difficulté qu'on avait jusqu'à ces dernières années, avant la découverte de l'anatoxine, à immuniser un cheval en vue de la préparation du sérum antitoxique, avec les facilités qu'apporte l'usage de l'anatoxine dans l'établissement de l'immunité antitoxique et dans la production de l'antitoxine spécifique, on se rend compte du grand service qui rend actuellement l'emploi de l'anatoxine dans la production rapide de l'antitoxine.

Prenons un cheval destiné à la préparation du sérum antidiphtérique. Immunisons-le d'abord à l'aide de 3 injections : 20, 40, 75 cc. d'une anatoxine diphtérique d'une valeur antigène intrinsèque de 10 unités (les deux premières à neuf jours d'intervalle, la troisième cinq jours après la seconde), puis continuons l'hyper-immunisation avec des doses progressi-

vement croissantes de l'anatoxine diphtérique : 100, 150, 200, 300, 350, 400 cc. injectées à 4 ou 5 jours d'intervalle.

Le dosage de sérum de cheval ainsi traité, nous révélera la haute valeur antitoxique et la grande richesse du sang en antitoxine diphtérique.

En effet, neuf jours après la dernière injection, ce sérum a un pouvoir antitoxique de 700 à 1.200 et même à 1.600 unités au centimètre cube.

Une comparaison rapide entre deux groupes de chevaux immunisés et hyperimmunisés les uns à l'aide de la toxine, les autres avec l'anatoxine diphtérique nous permettra sans doute de mieux comprendre le rôle de l'anatoxine dans la mise en évidence de l'antitoxine. Prenons comme exemple l'expérience fondamentale de M. RAMON faite sur deux séries de chacune 20 chevaux choisis au hasard sans tenir compte de l'immunité naturelle que peuvent présenter ces animaux.

Nous résumons d'après M. RAMON :

Après l'immunisation de chacun de ces 40 chevaux à l'aide de trois injections : 20, 40 et 75 cc. d'anatoxine diphtérique on continue l'hyperimmunisation de première série à l'aide des doses progressivement croissantes de l'anatoxine, exactement de la même manière que nous avons vu pour le cheval de notre précédent exemple, c'est-à-dire de : 100, 150, 200, 300, 350, 400 cc., injectés à quatre ou cinq jours d'intervalle. Pour la deuxième série on poursuit l'hyperimmunisation avec la toxine, ayant la même valeur antigène (de 10 à 13 unités) que l'anatoxine employée pour la première série, aux mêmes doses, même intervalle de temps et selon le même mode d'injection que pour la première série. La quantité de tapioca additionnée selon le procédé habituel, aux deux dernières doses et aussi la même pour la toxine que pour l'anatoxine. Cela pour dire qu'on a pris toutes précautions nécessaires pour que nul facteur, quel qu'il soit, ne puisse intervenir dans la production de l'antitoxine chez ces deux groupes de chevaux afin de préciser, d'une façon formelle, le rôle comparatif qui

joue la toxine d'une part et l'anatoxine d'une autre dans la mise en évidence de l'antitoxine. Ces chevaux sont saignés neuf jours après la dernière injection.

Voici le résultat de dosage d'antitoxine dans le sérum effectué au moyen de la floculation, puis par la méthode *in vivo*, qu'on trouvera dans le tableau ci-dessous :

CHEVAUX HYPERMUNISES

PAR LA TOXINE (Série N° 1)		PAR L'ANATOXINE (Série N° 2)	
N° des chevaux	Pouvoir anti-toxique des sérums	N° des chevaux	Pouvoir anti-toxique des sérums
—	—	—	—
	(Unités)		(Unités)
1.....	450	59.....	700
2.....	700	60.....	1.800
3.....	1.100	61.....	500
4.....	1.100	62.....	600
5.....	500	63.....	500
6.....	550	64.....	650
7.....	850	65.....	800
8.....	1.000	66.....	600
9.....	300	67.....	100
10.....	650	68.....	250
11.....	250	69.....	450
12.....	350	70.....	650
13.....	350	71.....	1.200
14.....	400	72.....	100
15.....	450	73.....	650
16.....	1.000	74.....	200
17.....	1.200	75.....	900
18.....	700 (1)	76.....	100
		77.....	450
		78.....	1.000

On constate très facilement, d'après ces résultats, que le sérum obtenu avec l'anatoxine atteint des titres aussi élevés

(1) Deux chevaux de cette série sont morts avant la fin de l'hyperimmunisation.

que celui préparé à l'aide de la toxine puisque la valeur antitoxique moyenne des sérums de chaque série est comprise entre 600 et 700 unités au cc.

Cette antitoxine obtenue grâce à l'anatoxine est identique dans ses propriétés à l'antitoxine dont la toxine provoque la formation. En effet, il est impossible de discerner si un échantillon d'antitoxine donné a été produit en utilisant la toxine ou bien l'anatoxine. En outre, en soumettant à la réaction de floculation, on se rend compte que la vitesse de cette réaction pour le sérum obtenu par l'anatoxine est du même ordre que celle des sérums préparés avec la toxine (RAMON).

De tout ceci on peut conclure que l'anatoxine joue un rôle considérable et de même ordre que la toxine dans la mise en évidence et la production de l'antitoxine ; sa préparation comode, ses propriétés spéciales et bien définies, surtout son inocuité et sa haute valeur antigène intrinsèque permettent son usage dans la production de l'antitoxine et la préparation du sérum antitoxique spécifique, cela avec une rapidité et une facilité extrêmes et un minimum de risques pour la santé et la vie de l'animal producteur.

LES PRINCIPALES ANATOXINES CONNUES

L'anatoxine diphtérique que nous venons de décrire, au point de vue de son importance, en détail, est la première anatoxine connue, la mieux étudiée et la plus importante. En dehors des grands profits que l'on retire dans l'hyperimmunisation des chevaux producteurs de sérum antidiphtérique, elle est aujourd'hui, nous le savons, la base de la nouvelle vaccination antidiphtérique. Depuis 1923-1924, le nombre des enfants qui ont été vaccinés avec succès par cette méthode dépasse des millions et le chiffre global de quantité d'anatoxine diphtérique préparée, seulement par l'Institut Pasteur de Paris dépasse aujourd'hui 10.000 litres.

Depuis la découverte de cette anatoxine on a essayé de préparer, à l'aide des diverses toxines microbiennes, végétales et animales d'autres anatoxines que la toxine diphtérique. Nous allons donner à titre d'exemple certaines de ces substances vaccinales qui sont les plus connues.

Anatoxine tétanique (RAMON et DESCOMBEY 1923)

La découverte de l'anatoxine tétanique suivit à peu de temps celle de l'anatoxine diphtérique. Ses propriétés et ses qualités sont les mêmes que celles de l'anatoxine diphtérique. La dose de formol additionnée à la toxine tétanique est 2,5/1.000.

On l'emploie aujourd'hui avec un grand avantage dans l'hyperimmunisation des chevaux producteurs du sérum anti-tétanique.

La vaccination antitétanique chez les animaux et chez l'homme est effectuée avec un grand succès à l'aide de l'anatoxine tétanique.

Anatoxine dysentérique (DUMAS, RAMON, BILLAL 1925)

A un litre de la toxine dysentérique, provenant d'une culture jeune de bacilles de Shiga,ensemencé sur le bouillon et séjourné pendant quinze jours à l'étuve de 37°, si on ajoute 6 cc. de formol commercial à 40 % et si on laisse ce mélange à l'étuve à 37° pendant une durée de 30 jours, on obtient une anatoxine dysentérique efficace et inoffensive pour les animaux de laboratoire.

Les lapins seront très facilement vaccinés contre l'infection expérimentale de dysenterie si on les injecte par deux fois à un intervalle de 8 à 10 jours, d'abord 0,5 et ensuite 1 cc. de cette anatoxine.

La propriété antigène de l'anatoxine dysentérique diminue par le chauffage à 65° pendant trois quarts d'heure. (Nous

avons vu, en ce qui concerne l'anatoxine tétanique et l'anatoxine diphtérique, que cette propriété ne diminue pas si on chauffe l'anatoxine pendant trois quarts d'heure à 68°.)

L'emploi de l'anatoxine dysentérique pour vaccination de l'homme est aussi encourageant. Mais on ne sait pas encore si cette méthode de vaccination de l'homme contre la dysentérie est aussi efficace en milieu épidémique.

Anatoxine venimeuse (RAMON 1924)

Le venin de serpent dilué dans l'eau physiologique (50 cgr. de venin de cobra pour 200 cc. d'eau) mélangé en raison de 4 à 5 pour 1.000 de formol, perd sa toxicité après un séjour de cinq semaines à l'étuve à 38°-40°.

Le lapin supporte une dose de 20 à 30 fois plus forte que la dose mortelle originale, sans inconvénient.

L'injection sous-cutanée de 5 à 15 centicubes de la solution à 0,50 pour 200 rend le lapin réfractaire contre 40 doses mortelles.

Cette anatoxine peut être employée avec succès dans l'immunisation des chevaux et la préparation de sérum antitoxique.

M. ARTHUS a étudié récemment ces anatoxines venimeuses sous le nom d'anavenin.

Une technique analogue a permis à M. RAMON de préparer avec l'abrine l'anatoxine correspondante.

Anatoxine du streptocoque scarlatineux

(R. DEBRÉ et G. RAMON 1929)

C'est avec un filtrat d'un bouillon Martinensemencé avec plusieurs souches (origine DICK) de streptocoque scarlatineux, ajouté à raison de 4 pour 1.000 de formol et abandonné, pen-

dant six semaines, à l'étuve à 38-40° que les auteurs ont préparé l'anatoxine scarlatineuse.

Les premiers essais de vaccinations antiscarlatineuses sont effectués avec succès chez l'homme. La continuation sur une plus grande échelle et surtout le contrôle épidémiologique pourront seuls dire si l'immunité ainsi obtenue, et qui se traduit par une réaction de Dick négative est bien une immunité active spécifique vis-à-vis de la scarlatine, et si, de plus, elle est durable.

Anatoxine gangréneuse (WEINBERG et PRÉVOI 1924)

Anatoxine botulique (WEINBERG et GOY 1924)

L'immunité antitoxique et la production de l'antitoxine dans la série animale

La production de l'antitoxine dans la série animale est étudiée pour la première fois et d'une façon remarquable par METCHNIKOFF dans les années qui suivirent la découverte de l'antitoxine par BEHRING et KITASATO.

En effet, en 1897, dans une longue et importante communication faite au Congrès international de Moscou, METCHNIKOFF avait apporté des renseignements très intéressants sur le sort de la toxine dans l'organisme et la production de l'antitoxine dans la série des êtres vivants.

En commençant ses études sur les bactéries et les organismes unicellulaires, il aboutit avec succès sur les grands mammifères, en appliquant toujours la méthode comparative à la recherche de l'influence de l'organisme sur les toxines.

C'est ainsi qu'en travaillant avec les bactéries et les organismes unicellulaires il a montré que les bactéries et les champignons inférieurs agissent sur la toxine d'une manière bien diverse. De même qu'il y a des microbes qui renforcent les toxines, il y en a d'autres qui les affaiblissent et même les détruisent. Le bacille coliforme isolé de l'air par exemple, conserve le pouvoir toxique d'un bouillon tétanique dans lequel on aensemencé le microbe. D'un autre côté, les produits de certaines torulas (des organismes unicellulaires) excitent pour ainsi dire le vibron cholérique à sécréter une toxine plus active que d'ordinaire.

Mais si les exemples des microbes renforçant la toxine ne sont pas nombreux, on connaît que bien plus nombreux sont les microbes qui affaiblissent et détruisent la toxine. C'est

ainsi qu'on connaît l'influence des bactéries très diverses, soit aérobies comme le groupe de *Bacillus mesentericus* ou *Bacillus subtilis*, soit anaérobies comme *Bacillus chauvæi*, qui affaiblissent et même détruisent la toxicité de la toxine tétanique pour les animaux plus sensibles.

La toxine diphtérique à son tour peut être également détruite par certains microbes (BEHRING).

Un bacille de groupe *subtilis* isolé, par METCHNIKOFF, de l'estomac humain, bacille sporulé et à pigment noir, tient la première place pour les bactéries détruisant les toxines. Il agit même sur l'abrine en la détruisant en deux à quatre semaines (Mme METCHNIKOFF), ainsi que sur le venin de serpent.

Les microbes, en agissant sur la toxine, ne donnent jamais des antitoxines, mais la toxine affaiblie ou détruite par les divers microbes peut quelquefois servir comme vaccin contre la toxine active.

« On peut donc considérer, disait METCHNIKOFF, comme établie la destruction des toxines par certains microbes et l'absence de production antitoxique sous l'influence de ceux-ci. L'idée de préparer des antitoxines à l'aide des microbes doit donc être abandonnée. »

Enfin, les nombreux travaux et recherches viennent affirmer, aujourd'hui, que les microbes s'immunisent contre les germes pathogènes et les substances nocives vis-à-vis de leur organisme.

Les nouvelles recherches de D'HÉRELLE sur le bactériophage nous montrent aussi, expérimentalement, l'immunisation des microbes contre les autres microbes. Mais le mécanisme par lequel l'organisme microbien arrive à se défendre et à s'immuniser n'est pas encore suffisamment étudié.

Dans tous les cas c'est un fait certain que « l'organisme animal apparaît donc seul capable de produire des antitoxines. Mais est-ce que l'organisme de tous les animaux est capable d'en procurer ou bien cette propriété est particulière à certains animaux ? »

Ce que nous allons voir tout de suite.

A l'aide de la toxine tétanique injectée à des arthropodes capables de vivre à des températures élevées (au-dessus de 32°), telles des scorpions (*Scorpio occitanus*) et des larves de l'*Oryctes nasicornis*, METCHNIKOFF a établi que ces animaux sont insensibles à la toxine tétanique et peuvent la garder pendant longtemps dans leur organisme sans montrer aucun symptôme morbide envers cette substance nocive. La toxine s'élimine peu à peu du sang chez le scorpion et s'accumule dans le foie tandis qu'elle reste pendant des mois intacte dans la circulation de la larve de l'*Oryctes*.

Mais, fait essentiel, malgré ce séjour si long de la toxine dans l'organisme de ces animaux, elle n'a jamais provoqué la formation de la moindre trace d'antitoxine.

Les expériences recommencées sur les sangsues avec la toxine tétanique, absorbée par ces animaux donne le même résultat : La toxine reste longtemps dans le tube digestif des sangsues gardé à 32° sans provoquer la production d'antitoxine.

Tout récemment METALNIKOV a employé les diverses toxines diphtérique, tétanique, cholérique, dysentérique, tuberculine, botulique et la toxine de la gangrène gazeuse, chez les insectes en particulier les chenilles de *pyrausta*. Tous ces insectes ont supporté des doses relativement grandes de ces toxines et il n'a jamais pu démontrer des traces d'antitoxine dans l'organisme de ces insectes.

CHORINE, dans ces dernières années, a démontré que les chenilles de *galliera mellonella* peuvent s'immuniser contre la toxine diphtérique. Il a pu même les vacciner avec l'anatoxine de RAMON. Dans une autre série d'expériences, le même auteur a montré que le sang des chenilles immunisés à l'aide de l'anatoxine diphtérique est capable de conférer l'immunité passive aux chenilles neuves. De même le sang de chenilles immunisées est capable de neutraliser *in vitro* la toxine diphtérique.

De toutes ces expériences, il ressort, d'après CHORINE, que parmi les invertébrés, les chenilles de *Galleria* sont exceptionnellement capables d'élaborer une substance analogue à l'antitoxine des animaux supérieurs.

En montant ainsi dans la série animale et en suivant toujours les travaux de METCHNIKOFF nous arrivons aux vertébrés inférieurs et à sang froid, tels que les grenouilles, les poissons et les tortues.

Les poissons (la carpe et des amphibies) résistent à des quantités de la toxine tétanique à condition d'être maintenus à basse température. La toxine, en gardant toujours son pouvoir toxique pour les animaux sensibles, reste dans le sang de ces animaux et cela pendant des mois. Quant à la grenouille il semble qu'elle soit plus sensible au poison tétanique que les poissons surtout quand il s'agit de la grenouille grise. Il n'est plus nécessaire d'élever la température de l'eau pour obtenir l'évolution (MARIE).

Les tortues en général sont réfractaires à la toxine tétanique ; elles supportent des quantités très grandes de cette toxine en la gardant dans leur sang, comme dans une glacière, à l'état toxique et tétanigène.

Cette toxine se conserve dans le sang et elle peut passer dans le transsudat péritonéal toujours à l'état actif, si on garde la tortue à l'étuve à 36°.

Dans toutes ces expériences on n'a pas pu montrer la moindre trace d'antitoxine. Les vertébrés inférieurs à sang froid comme les invertébrés (à l'exception des chenilles de *Galleria*) ne sont donc pas capables de préparer l'antitoxine malgré la présence de la toxine à l'état actif dans leur circulation

Le premier exemple de la procution d'antitoxine dans la série animale est, d'après METCHNIKOFF, le caïman (*Alligator mississippiens*).

Cet animal est réfractaire à la toxine tétanique comme les autres espèces d'animaux à sang froid que nous venons de voir et il supporte les quantités énormes de la toxine tétanique

(dose capable de tuer 6.000 souris) sans manifester aucune réaction thermique, à la seule condition de le maintenir à température de moins de 20° (cet animal peut vivre longtemps à une température plus élevée... de 30° à 37°). Mais si on a le soin de garder cet animal, une fois inoculé avec la toxine, à la température de 32-37°, on constate au bout d'un mois et davantage (pendant lequel le sang est toujours toxique et tétanogène pour les animaux sensibles), qu'on ne peut trouver trace de la toxine dans le sang, mais celui-ci ne se montre pas, non plus, de pouvoir antitoxique. Le sang est, au moins apparemment, comme le sang d'un caïman normal qui n'a reçu aucune goutte de la toxine.

Mais, après deux mois (58 jours), l'antitoxine apparaît dans le sang d'une manière incontestable.

Les caïmans plus âgés sont susceptibles de développer cette propriété (la production d'antitoxine) beaucoup plus que chez les caïmans jeunes, et que leur sang peut devenir antitoxique au bout de quelques jours seulement.

Les crocodiles sont les meilleurs producteurs d'antitoxine tétanique parmi les animaux à sang froid. Ils sont aussi capables de fournir l'antitoxine cholérique (METCHNIKOFF).

Nous avons vu jusqu'ici en commençant des organismes unicellulaires, les plus petits qui existent (les microbes), d'abord les organismes absolument indifférents à la toxine tétanique chez qui la dose plus ou moins grande de la toxine ne provoque aucun changement dans l'état vital de ces animaux. La toxine se conserve plus ou moins longtemps dans le sang (larve de l'*Oryctes*), ou se localise dans le foie (scorpion), comme dans une véritable glacière, sans fournir aucune trace d'antitoxine.

De même nous avons vu chez les invertébrés, les organismes aussi indifférents que les précédents, mais à condition qu'on les maintienne à basse température (le poisson et les grenouilles) sinon ils deviennent sensibles (à la température de 32-37°)

et succombent à l'inoculation d'une dose élevée de toxine sans toujours fournir d'antitoxine.

Nous avons enfin attiré l'attention sur les sauropsidés à sang froid réfractaires et indifférents à la toxine tétanique, à basse température, mais susceptibles de produire de l'antitoxine si on les maintient à la température de 32-37°.

Nous allons voir maintenant un autre exemple de sauropsidés, mais à sang chaud, la poule, chez qui il se passe d'une manière un peu particulière.

Pour la première fois en 1891 VAILLARD a démontré que la poule, animal réfractaire à la toxine tétanique, est capable de fournir de l'antitoxine si on lui injecte une quantité énorme de la toxine tétanique. Le sang de la poule longtemps après l'injection de la toxine, est tétanogène, puis il devient neutre, le sang n'est ni toxique ni antitoxique. Au bout de quelques semaines, le sang commence à devenir antitoxique d'une manière incontestable.

KITASATO, soit seul soit avec BRIGER ou WASSERMANN niait cette production de l'antitoxine dans le sang des poules, longtemps après la constatation de VAILLARD.

Plus récemment, en 1928, M. RAMON a publié une étude complète de l'immunité naturelle et acquise vis-à-vis de l'intoxication tétanique chez la poule.

Il a constaté, en particulier, que la résistance naturelle de la poule à la toxine tétanique n'est pas illimitée et il suffit de quelques centimètres cubes d'une toxine très active pour entraîner la mort de cet animal.

Des quantités moindres, injectées dans les muscles de la cuisse par exemple, provoquent des accidents tétaniques locaux qui peuvent durer des semaines. Mais en injectant sous la peau d'une poule une dose de 2 cc. d'une toxine tétanique tuant à la dose de 1/15.000 de cc. et en 4 jours un cobaye de 350 gr., on constate ce que VAILLARD avait indiqué autrefois : le sang est tétanigène 24 heures après l'injection de la toxine, il devient neutre au 10^e jour. Au bout de 14-15 jours, on trou-

vera la trace de l'antitoxine et, au 20^e jour, 1 cc. de ce sérum neutralise une quantité de toxine représentant plus de 10 doses mortelles pour le cobaye. La poule acquiert ainsi une immunité artificielle qui accroît, pour ainsi dire, son immunité naturelle.

Dans la série des vertébrés supérieurs et les mammifères en particulier, nous avons, en ce qui concerne la production de l'antitoxine, deux grands groupes d'animaux, à savoir :

1^o Les animaux naturellement réfractaires ;

2^o Les animaux sensibles à la toxine.

Dans le premier groupe nous avons des animaux naturellement réfractaires à la toxine et qui résistent expérimentalement aux doses très élevées. Mais cette résistance expérimentale n'est pas illimitée et on peut arriver à vaincre cette résistance par les doses plus élevées d'une toxine très forte. La recherche de l'antitoxine est tantôt positive (mais difficile à prouver — chien), tantôt négative chez les autres, ou si peu que les méthodes et les moyens de mise en évidence de ces antitoxines dans l'organisme ne permettent pas aujourd'hui de les déceler avec certitude (le rat).

Dans le deuxième groupe, les animaux très sensibles peuvent s'immuniser à l'égard de la toxine en question, de manière à supporter plusieurs milliers de la dose mortelle de la toxine pour l'animal témoin. L'antitoxine se révèle dans leur sang dès que l'immunisation se réalise et augmente avec la quantité de toxine injectée. On arrive ainsi à hyperimmuniser les animaux contre la toxine en question et à préparer des quantités considérables de sérum antitoxique.

Mais l'intensité et la rapidité de la production ainsi que la qualité et la quantité de l'antitoxine ne sont pas les mêmes chez les animaux producteurs ; elles varient non seulement avec l'espèce animale en question, non seulement avec la qualité et la quantité de la toxine employée, mais aussi avec une foule de facteurs divers venant de l'extérieur de l'organisme animal ou bien de l'animal même (les facteurs individuels).

Nous allons voir en détail dans la deuxième partie de ce travail, tous ces facteurs qui influencent cette production de l'antitoxine.

En règle générale l'organisme qui résiste moins se prépare mieux pour se défendre et les animaux les plus sensibles à la toxine sont, dans un grand nombre de cas les meilleurs producteurs de l'antitoxine (BEHRING).

Nous allons montrer dans le tableau ci-dessous un schéma de la production de l'antitoxine dans la série des êtres vivants.

ANIMAL D'EXPÉRIENCE	SENSIBILITÉ A L'ÉGARD DE TOXINE		PRODUCTION DE L'ANTITOXINE
	NATURELLE	EXPÉRIMENTALE	
Chenilles d'oryctes..	—	—	0
Scorpion	—	—	0
Sangsue	—	—	0
Chenille de pyrausta	—	—	0
Chenille de galléria..	—	+	+
Tortue	—	—	0
Poissons (carpes) ...	—	—	0
			(à basse température.)
Poissons (carpes) ...	—	+	0
			(température : 32°.)
Grenouille	+	+	0
Caïman	—	—	0
			(à basse température.)
Caïman	—	—	+
			(température : 32-37°.)
Crocodile	—	—	+
Poule	—	+	+
Cobaye	+	+	+
Cheval	+	+	+

La sérothérapie antitoxique

« La découverte de la toxine diphtérique par ROUX et YERSIN en 1887 et la mise en évidence des antitoxines à laquelle aboutirent les études de BEHRING et KITASATO en 1890 constitue le fondement sur lequel repose toute la sérothérapie moderne. » S. SCHMIDT.

Préparation du sérum antitétanique

Si l'action curative du sang des animaux rendus réfractaires à la toxine tétanique n'a pas trouvé beaucoup de partisans dans le monde bactériologique, par contre son action préventive est devenue universellement connue dès les premières recherches sur le tétanos et la diphtérie. Il ne restait donc qu'à préparer ce sérum en quantité et appliquer thérapeutiquement cette antitoxine tétanique présente dans le sang des animaux immunisés contre le tétanos.

MM. ROUX et VAILLARD en employant des méthodes sûres pour immuniser les animaux contre la toxine tétanique arrivent les premiers à préparer le sérum antitoxique en grande quantité.

L'immunisation est obtenue par l'injection de doses progressivement croissantes, d'abord de toxine atténuée (iodée en raison de trois parties de toxine et une partie de solution (iodo-iodurée), et ensuite de toxine pure.

On arrive ainsi à hyperimmuniser le cheval après une série d'injections de toxine de sorte que la dernière injection comprenant 250 centicubes de toxine est supportée sans inconvénient. La durée de cette opération est de 80 jours à peu près. On saigne l'animal après quelques jours et on injecte de petites doses de toxine à intervalles rapprochés pour avoir toujours un sérum très actif

Ce sérum n'est pas curatif ; ce qui l'empêche d'être curatif c'est le degré trop avancé des lésions lorsque les premiers symptômes apparaissent.

La sérophyxie du tétanos a été réalisée d'abord, en médecine vétérinaire, par NOCARD. Cet auteur avait observé que l'ation préventive du sérum antitétanique est plus remarquable chez les grands animaux, le cheval par exemple, que chez les animaux de laboratoire.

NOCARD avait constaté en effet que chez le cheval infecté avec une dose mortelle de la toxine tétanique, il suffit d'injecter une faible dose de sérum, vingt-quatre et même quarante-huit heures après l'injection de toxine, pour le sauver à coup sûr. Chez 2.700 chevaux prédisposés au tétanos et inoculés préventivement avec le sérum antitétanique, il n'avait observé qu'un seul cas de tétanos bénin chez un cheval traité cinq jours après l'accident.

Au contraire 220 cas de tétanos ont été constatés chez les chevaux prédisposés et non traités.

Plus tard ROUX, QUINARD, RAZY et VAILLARD préconisèrent ce sérum en thérapeutique humaine et en 1906, au Congrès de chirurgie, la question fut définitivement jugée « et il est posé désormais comme règle thérapeutique absolue que tout individu suspect doit être traité par le sérum ». Et tout récemment l'Académie de médecine a formulé les principes actuels de la sérothérapie préventive du tétanos.

Le sérum antidiphtérique

L'année 1894 est particulièrement consacrée par MM. ROUX et MARTIN à la préparation de sérum antidiphtérique ; c'est le premier sérum curatif. Ce sérum a donné d'emblée des résultats remarquables (Congrès de Budapest, 1894).

Les animaux sont immunisés avec la toxine diphtérique additionnée d'iode (toxine iodée).

Le cheval, d'après M. ROUX, est l'animal de choix parce qu'il est plus facile à immuniser et parce que son sérum, même à dose considérable, est inoffensif pour les animaux de laboratoire et aussi pour l'homme.

Le mode et la durée de l'immunisation sont les mêmes que ceux de la préparation du sérum antitétanique.

Aujourd'hui on emploie dans l'immunisation des chevaux contre la diphtérie et le tétanos l'anatoxine de RAMON. Nous verrons plus loin la facilité et l'avantage de cette méthode d'immunisation de cheval qui a apporté un grand progrès dans la préparation du sérum antitoxique.

Depuis la préparation du sérum antidiphtérique par ROUX et MARTIN, un grand nombre de savants : WASSERMANN (1902), BAUDET, MARTIN, LEPSTEIN (1903), KOLLE, PRÉVOT et LOISEAU, etc., etc., ont étudié les différentes méthodes de préparation de sérum en vue d'améliorer sa valeur thérapeutique en employant soit de la toxine pure plus ou moins modifiée, soit de la culture totale de bacille de LÖFFLER (vivant ou tué), soit enfin en s'adressant aux diverses voies d'inoculation : sous-cutanée, intraveineuses, etc. etc.

Tout récemment (1931), RAMON, LEGROUX, DÈBRE et THIROLLOIX ont étudié un mode de préparation du sérum antidiphtérique qui mérite d'attirer l'attention.

Comme antigène, ils se sont adressé à des germes diphtériques vivants d'une souche d'un bacille très pathogène provenant de l'épidémie parisienne de 1929. On ensemente largement des boîtes de Roux (20 à 30 à chaque opération). Après un séjour de vingt-quatre à trente-six heures on émulsionne la totalité de la récolte dans l'eau physiologique, puis on centrifuge et on lave afin d'éliminer aussi complètement que possible la toxine produite. Cet antigène ainsi préparé, on l'injecte aux chevaux à raison de 10 centimètres cubes pour la première fois et ensuite des doses croissantes jusqu'à 150 centicubes. On saigne le cheval dix jours après la dernière injection.

Le sérum ainsi obtenu, ainsi que tous les sérums préparés d'après les différentes méthodes que nous venons de décrire, ne se comporte pas autrement vis-à-vis de l'infection diphtérique que le sérum obtenu avec la toxine spécifique ou ses dérivés (anatoxine). Ceci prouve que quel que soit son mode de préparation le sérum antidiphtérique est « un » dans son action thérapeutique expérimentale ; il s'agit uniquement, grâce à sa plus ou moins grande richesse en antitoxine spécifique.

DEUXIEME PARTIE

DE L'APTITUDE DES ANIMAUX DOMESTIQUES A LA PRODUCTION DES ANTITOXINES

La grande difficulté que présentait l'immunisation des animaux avant la découverte de l'anatoxine, limitait les tentatives de recherches expérimentales pour l'étude de l'immunité antitoxique.

La cause principale de cette difficulté résidait dans le manque d'un antigène simple et commode à manier, susceptible de conférer rapidement, à coup sûr et sans risque, l'immunité antitoxique et spécifique. En un mot, le défaut de matériel devait ralentir pendant longtemps le cours des études fiévreuses qui avaient suivi la découverte des toxines et des antitoxines.

En effet, en feuilletant les annales et les périodiques à la recherche des observations de ce genre, on est surpris de constater une période de silence de plus de vingt ans. Durant cette période les communications devinrent moins fréquentes et les documents nouveaux de plus en plus rares.

A quoi peut-on attribuer ce silence si ce n'est à la difficulté de réaliser des essais étendus et précis en ce qui concerne l'immunité antitoxique.

Prenons un cobaye par exemple et injectons-lui sous la peau 1 cc. d'anatoxine diphtérique, d'une valeur antigène intrinsèque de 10 unités. Quinze jours après cette première injection, notre cobaye résiste à plusieurs doses mortelles pour un cobaye neuf et, après un mois, il supporte au moins 50 doses mortelles. Si l'on songe aux difficultés que l'on avait

autrefois pour conférer au cobaye une immunité beaucoup moindre, on se rend compte de la simplicité et de l'efficacité de la méthode à l'anatoxine, et de la facilité que cette méthode apporte aujourd'hui dans les recherches continues de l'immunité antitoxique.

Pour montrer la difficulté de réaliser l'immunité antitoxique chez les animaux d'expériences, avant la découverte de l'anatoxine, il nous paraît utile de donner un exemple de l'ancienne méthode d'immunisation antitoxique.

Voici comment, d'après ROUX et VAILLARD, on réalisait autrefois l'immunisation d'un lapin par la toxine diphtérique.

Le premier jour de l'expérience, le lapin reçoit sous la peau un mélange de 3 cc. de toxine et de 1 cc. de solution de Gram.

Le 5^e jour de l'expérience, le lapin reçoit sous la peau un mélange de 5 cc. de toxine et de 2 cc. de solution de Gram.

Le 9^e jour de l'expérience, le lapin reçoit sous la peau un mélange de 12 cc. de toxine et de 3 cc. de solution de Gram.

Huit jours après cette troisième injection, l'animal donne un sérum qui, mélangé à son volume de toxine, rend celle-ci inoffensive. Dès ce moment, on peut injecter de la toxine pure, soit successivement 5 cc., 10 cc., 15 cc., 20 cc., 30 cc., 40 cc., etc., etc...

Les animaux maigrissent quelquefois énormément, l'appétit disparaît souvent et nombreux sont ceux qui succombent au cours de cette immunisation.

La marche de l'immunisation est très lente ; il faut attendre des semaines pour avoir un animal immunisé et il ne faut pas se presser surtout par crainte de tuer l'animal. En effet, dans ce genre d'expérience, aller lentement, c'est gagner du temps comme disait M. Roux à ce propos dans l'étude de la sérothérapie antidiphtérique.

En comparant ces deux méthodes d'immunisation que nous venons de décrire (du cobaye par l'anatoxine d'une part et

du lapin par la toxine + solution de Gram d'autre part) et en se rappelant que la plupart des animaux immunisés par la méthode ancienne ne résistaient pas à ces manipulations longues et dangereuses et mourraient parfois avant d'être immunisés, c'est-à-dire avant que l'on ait pu tirer certains résultats de l'expérience, on se rend compte de la difficulté de réaliser une expérimentation vraiment sûre.

La difficulté est encore plus grande quand on se propose de préparer un sérum antitoxique de valeur plus élevée. Par exemple, pour obtenir une immunité solide et un sérum fort, on employait des toxines de plus en plus fortes en prenant toutes les précautions nécessaires afin d'empêcher l'atténuation de la toxine avant l'injection aux animaux.

En un mot, on cherchait de la toxine la plus nocive pour l'organisme animal sans penser à la santé et à la résistance de cet organisme. Le fait que l'animal ne mourait pas immédiatement sous l'action nocive de la toxine était le principal.

On ne se préoccupait guère des altérations d'ordre physiologique qui pouvaient faire suite aux injections de toxine et entraver les résultats futurs.

Or, la grande nocivité de la toxine et la quantité formidable (jusqu'à plusieurs litres pour un cheval) qu'on injectait aux animaux producteurs d'antitoxine avaient leur répercussion sur leur état de santé. L'amaigrissement progressif, la faiblesse extrême, le poil piqué qu'on rencontre généralement chez les animaux ainsi immunisés et surtout l'aspect macroscopique d'un foie cuit et infectieux que l'on rencontrait souvent à l'autopsie étaient les principaux signes d'une intoxication profonde.

C'est le moment de citer la phrase de S. SCHMIDT, un savant qui fait autorité en matière d'immunité antitoxique. Il déclare dans une de ses dernières publications :

« Précisément, si l'on tient compte des difficultés avec lesquelles les chercheurs (ROUX et YERSIN, BEHRING et KITASATO, EHRLICH, ARRHÉNIUS et MADSEN, SACHS, DANYSZ, MORGENROTH,

KRAUS, etc.) ont été aux prises, on doit garder une admiration profonde pour les résultats obtenus qui, dans la plupart des cas, ont été nettement confirmés par les travaux récents, entrepris *in vitro* grâce au procédé physico-chimique introduit par RAMON ; ce procédé devait permettre de se passer dans une large mesure de l'organisme vivant. »

L'anatoxine diphtérique permet donc de conférer sans difficulté à l'animal d'expérience une immunité antitoxique qui, par ailleurs, peut être appréciée avec une exactitude suffisante, soit par l'épreuve directe, soit par le dosage de l'antitoxine *in vitro* ou *in vivo*. C'est ainsi qu'un grand nombre de ces phénomènes inconnus ou insuffisamment connus, avant la découverte de l'anatoxine sont étudiés depuis d'une manière complète.

L'imperméabilité du placenta au passage de l'anatoxine et la perméabilité de cette membrane quand il s'agit de l'antitoxine (RAMON, NATTAN-LARRIER et GRASSET) ; l'immunisation active chez les cobayes et les lapins par injection de l'anatoxine suivant celle d'un peu de bile ou d'huile de ricin (RAMON et E. GRASSET), l'inefficacité de cette méthode d'immunisation chez l'homme (RAMON et ZOELLER).

Enfin l'immunisation, par voie nasale, chez l'homme, avec l'anatoxine (RAMON-ZOELLER), etc., etc... sont des exemples qui montrent tout le profit que l'on peut tirer de l'utilisation de l'anatoxine dans le domaine expérimental.

L'étude de l'aptitude des animaux à la production de l'antitoxine va nous fournir encore un autre exemple d'une expérimentation jusqu'ici difficile et qui devait être grandement facilitée par la mise en œuvre de l'anatoxine.

La production de l'antitoxine dans l'organisme animal ne dépend pas seulement, comme on le sait, de la quantité ou de la qualité de l'antigène mis en œuvre, mais encore de l'aptitude de l'animal à fabriquer l'antitoxine aux dépens de la matière première qui lui est fournie.

Nous avons vu déjà en détail que la seule inoculation de

la toxine n'est pas capable de provoquer la production de l'antitoxine. Un grand nombre des organismes (animaux à sang froid) sont indifférents à cette inoculation ; la toxine inoculée circule dans leur sang ou se localise dans les organes en y restant pendant longtemps, toujours à l'état de toxine non transformée et sans provoquer l'apparition de la trace d'antitoxine.

La présence de la toxine n'est donc pas suffisante pour la production de l'antitoxine et pour que cette production ait lieu il faut que l'organisme de l'animal récepteur soit apte à réagir.

C'est ainsi que l'espèce à laquelle appartient l'animal en question, l'individualité et nombre de facteurs principaux et secondaires ont une influence plus ou moins marquée dans la production de l'antitoxine et c'est cet ensemble de facteurs qui constituent l'aptitude des animaux à la production de l'antitoxine.

En outre, la sensibilité naturelle plus ou moins grande de l'organisme à l'égard de la toxine mise en œuvre joue un grand rôle dans la production de l'antitoxine.

Nous avons vu dans le chapitre consacré à l'étude de la production de l'antitoxine dans la série animale que les organismes indifférents à la toxine ne se prêtent pas ou se prêtent mal à la production d'antitoxine. D'après BEHRING, les animaux les plus sensibles à la toxine sont les meilleurs producteurs d'antitoxine.

ROUX avait remarqué que si l'on insiste le principe de BEHRING, le cheval doit être un mauvais producteur de l'antitoxine diphtérique, puisqu'il n'a pas une sensibilité très accusée vis-à-vis de cette toxine. Or le cheval, comme l'a remarqué M. ROUX, est un très bon producteur de cette antitoxine, aussi est-ce à lui que l'on s'adresse pour la préparation du sérum antidiphtérique, mais ici intervient la question de l'immunisation naturelle ou occulte.

En tous cas, il faut remarquer la sensibilité des animaux à

la toxine comme un facteur très important dans la production de l'antitoxine. Aussi nous l'étudierons en détail ainsi que les autres facteurs appartenant en propre aux animaux. Nous donnerons dans le tableau ci-joint un sommaire des chapitres que nous allons envisager.

I. — Les différents facteurs de production des antitoxines appartenant en propre aux animaux :

1° Sensibilité des animaux à la toxine (diphthérique et tétanique) ;

2° Espèce : *Recherches personnelles* ;

3° L'individualité : Facteurs principaux et secondaires.

A) *Facteurs principaux* :

a) L'immunité d'origine occulte : les chevaux à réaction de Schick positive et négative ;

b) Les groupes sanguins : *Recherches personnelles*.

B) *Facteurs secondaires* :

Race, Sexe, Age, Habitudes, etc., etc.

II. — Modifications de la production sous l'influence :

a) Du milieu où vit l'animal ;

b) De l'alimentation ;

c) Du mode d'injection : injection de rappel ;

d) De la stimulation de l'organisme par certaines substances non spécifiques : tapioca, alun de potasse et chlorure de calcium.

Les différents facteurs de production des antitoxines appartenant en propre aux animaux

1° *Sensibilité des animaux à la toxine diphtérique et tétanique*

Longtemps avant la découverte des toxines microbiennes on savait déjà que la sensibilité des animaux à l'égard des maladies toxi-infectueuses comme la diphtérie et le tétanos, n'est pas la même et qu'à côté des animaux sensibles à la diphtérie ou au tétanos il y a des animaux plus ou moins réfractaires à ces maladies. Mais c'est surtout après la découverte des toxines qu'on a connu le degré de sensibilité des animaux vis-à-vis de ces toxines.

C'est ainsi qu'en étudiant l'effet de la toxine sur divers animaux on est arrivé, dès la découverte des toxines microbiennes, à discerner, à côté des animaux réceptifs à ces toxines, certains animaux réfractaires et insensibles.

Mais nous avons vu que la nocivité des diverses toxines d'origines différentes n'est pas la même. Ainsi la nocivité des toxines préparées lors des premières recherches, il y a quarante ans, est très inférieure à celle des échantillons actuels, soit parce que les souches isolées sont plus toxigènes, soit par suite d'amélioration dans la préparation des bouillons.

Avec les toxines tétaniques et diphtériques très nocives, que l'on sait préparer aujourd'hui, aucun, ou presque, des animaux domestiques, n'échappe plus, expérimentalement à ces intoxications. C'est ainsi que la poule, animal qui a pu passer pour réfractaire à l'intoxication tétanique, ne l'est plus aujourd'hui ; une dose élevée d'une toxine très forte est capable de l'intoxiquer à coup sûr. De même le rat, considéré comme

l'animal le plus résistant à la toxine diphtérique, succombe aujourd'hui à une dose relativement peu considérable d'une toxine très nocive.

Il ne s'agit donc plus de parler de l'état réfractaire d'un organisme animal vis-à-vis de la toxine diphtérique ou tétanique, puisque nous avons vu que l'organisme le plus réfractaire ne résiste plus aujourd'hui à une dose très élevée d'une toxine très active.

Cependant on sait que la sensibilité des animaux vis-à-vis d'une même toxine n'est pas la même : De même qu'il y a des animaux extrêmement sensibles à une toxine donnée, de même il y a des animaux qui sont extrêmement résistants à l'action de cette toxine.

Or, entre ces deux limites ultra-sensible et extra-résistante, si on peut dire, il y a des degrés de sensibilité très différents que nous allons étudier maintenant chez les principales espèces animales domestiques.

Le degré de sensibilité des animaux à la toxine diphtérique

Le cobaye est l'animal le plus sensible vis-à-vis de la toxine diphtérique. Il est l'animal de choix pour l'étude de cette toxine. Une toxine fraîchement filtrée tue cet animal à la dose de 1/1.000 de cc. Une dose de 1/5.000 de centicube de cette toxine et même moins injectée sous la peau, produit une lésion locale (œdème et escarre) et 1/10.000 de cc. introduit dans la peau provoque encore une réaction intradermique bien apparente.

La toxine diphtérique possède donc une affinité extrêmement marquée pour le tissu conjonctif et derme du cobaye.

Le lapin est moins sensible que le cobaye.

En appliquant de la toxine diphtérique sur les muqueuses de cet animal, même en l'absence de toute lésion, ROGER et BAYEUX, COPPEZ, MORAX et EBNASSIAN ont obtenu des lésions

locales, parfois de véritables fausses membranes. Ces constatations permettent d'attribuer à l'intoxication une part réelle dans la production de ces phénomènes dans la diphtérie.

Le pigeon, et surtout les petits oiseaux, meurent rapidement avec des doses très faibles. Une toxine nocive au 1/10.000 de centicube pour le cobaye de 250 à 300 grammes, tue le pigeon de même poids à 1/500 de cc.

La poule est aussi très sensible à la toxine diphtérique. Elle succombe facilement à 1/100 ou à 1/200 de cc.

Les moutons et surtout les chèvres sont les plus sensibles parmi les grands ruminants à l'intoxication diphtérique. 5 cc. d'une toxine ordinaire sont suffisants pour tuer ces animaux (NOCARD).

La vache elle aussi ne supporte pas une dose de 5 cc. de la toxine diphtérique.

Pour le cheval, la sensibilité est très variable suivant les sujets. Certains qui font presque d'immunité naturellement acquise résistent à plusieurs centicubes, d'autres qui n'ont pas ou très peu d'immunité succombent à 1/10 de centicube.

L'âne réagit beaucoup plus en général que le cheval, un ânon de six mois peut succomber à la suite d'une injection sous-cutanée de 1/2 cc. de toxine.

Les souris et surtout les rats sont très résistants : ils étaient considérés depuis très longtemps comme des animaux absolument réfractaires à la toxine diphtérique. Mais depuis que l'on dispose de toxine beaucoup plus nocive qu'autrefois on a pu se rendre compte que cette résistance n'est pas illimitée et qu'avec une dose très forte d'une toxine très active, on peut arriver à vaincre cette résistance. La dose mortelle de la toxine diphtérique la plus nocive est très élevée pour le rat. Une toxine fraîchement filtrée tuant un cobaye de 250 à 300 g. au 1/1.000 de cc. et un pigeon de 250 g. au 1/500 de cc. ne se montre nocive pour un rat de 150 g. qu'à la dose de 0,75 à 1 cc. C'est-à-dire pour tuer un rat de 150 g., il faut environ 700 à 1.000 doses mortelles pour un cobaye de 300 g.

La toxine diphtérique ne possède aucune affinité pour le tissu conjonctif et le derme du rat ; injectée même à la dose de 0,25 cc. sous la peau ou de 0,1 cc. dans le derme ne laisse aucune trace.

Sensibilité des principaux animaux à la toxine diphtérique d'après BEHRING et suivant une échelle en commençant par les animaux les plus sensibles :

- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| (1) La chèvre | (4) Le mouton | (7) Le chien |
| (2) Le cheval | (5) Le lapin | (8) Le rat |
| (3) La vache | (6) Le cobaye | (9) La souris |

Le degré de sensibilité des animaux à la toxine tétanique

Les souris, les rats blancs et les cobayes sont les plus sensibles à l'intoxication tétanique.

Le cobaye est, ici aussi, l'animal de choix. 1/15.000 d'une toxine très active tue en quatre jours un cobaye de 350 g. 1/75.000 cc. de cette toxine est capable de provoquer des accidents tétaniques locaux chez cet animal. La souris est encore plus sensible.

Le lapin exige des doses cent fois supérieures à celles actives chez le cobaye. La mort ne survient que vers le 5^e et même le 10^e jour après l'apparition des accidents.

L'homme est en particulier très sensible à la toxine tétanique. Une piqûre de la main avec l'aiguille d'une seringue venant de servir à une injection est capable de déclencher des accidents d'intoxication tétanique.

Les solipèdes se placent au premier rang des animaux domestiques quant à leur aptitude spécifique. L'inoculation de 6 mg. d'une toxine sèche très active tue le cheval à coup sûr (NOCARD). Il est certain qu'avec les toxines que l'on prépare actuellement la dose mortelle pour un cheval est encore beaucoup moindre.

Les bovidés sont beaucoup moins sensibles à l'action de la

toxine tétanique que les solipèdes. Ils supportent aisément des doses de toxine dix fois supérieures à la dose toujours mortelle chez le cheval.

Le mouton et le porc sont également peu sensibles à la toxine tétanique.

Le chien est plus résistant. Il faut, pour le tétaniser sûrement, lui injecter 5 à 6 cc. d'une toxine dont 1/2 cc. suffit à tuer un cheval de 450 k. La grenouille est aussi sensible à l'action de la toxine. Il n'est point nécessaire d'élever la température de l'eau pour obtenir l'intoxication (MARIE). La grenouille grise est plus sensible que la grenouille ordinaire.

Les oiseaux présentent une extrême résistance : le pigeon et surtout la poule supportent sans réagir des quantités considérables de la toxine, de sorte que pendant longtemps on a considéré la poule comme un animal réfractaire. Mais aussi prononcée que soit la résistance naturelle de la poule vis-à-vis de cette intoxication, elle n'est pas illimitée et il suffit de quelques centicubes de la toxine très active que l'on sait aujourd'hui produire, pour vaincre cette résistance et entraîner la mort. La dose mortelle de la toxine tétanique pour la poule correspond à environ 100.000 doses mortelles pour le cobaye. Des quantités moindres, injectées dans les muscles de la cuisse par exemple, provoquent des accidents tétaniques locaux particuliers : démarche titubante, fléchissement du membre injecté qui est parfois complètement retourné, etc. Ces accidents peuvent durer des semaines, puis disparaître lentement (RAMON).

Dans tous les cas, chez n'importe quel animal et avec n'importe quelle dose d'une toxine microbienne on aura toujours une période d'incubation plus ou moins longue.

Pendant toute la durée d'incubation et presque aussitôt après l'inoculation de la toxine on ne peut plus trouver la trace de la toxine dans les humeurs, les tissus ou les excréta de l'animal. Il paraît donc que la toxine se fixe sur certains

organes (MARIE). La toxine a une affinité particulière pour les tissus nerveux et c'est là qu'il faut aller la chercher après l'inoculation (expérience de WASSERMANN et TAKAKI avec la toxine tétanique). L'injection intraveineuse ou intrapéritonéale de la toxine tétanique produit d'emblée un tétanos généralisé. L'injection intracérébrale produit un véritable tétanos cérébral (ROUX et BOREL). La race paraît avoir quelque influence sur la réceptivité. L'âge ne modifie en rien l'aptitude des organismes (d'après NOCARD).

Cependant les animaux nouveau-nés, de même que le nouveau-né de l'espèce humaine semblent avoir une résistance proportionnellement plus grande que celle de l'adulte de même espèce.

2° *De l'aptitude des animaux d'espèces différentes dans la production de l'antitoxine*

Parmi tous les animaux domestiques capables d'élaborer l'antitoxine, les lapins méritent, au point de vue historique, d'être cités au premier rang. C'est en effet sur les lapins que BEHRING et KITASATO ont fait leur remarquable découverte de l'antitoxine et pendant une période assez longue après la découverte de l'antitoxine on n'utilisa que les lapins, soit pour mettre en évidence les antitoxines soit pour préparer des sérums antitoxiques en petites quantités. C'est aussi avec cet animal que MM. ROUX et YERSIN ont fait leur premier essai de préparation de sérum antitétanique.

C'est plus tard seulement que l'on s'est adressé aux autres animaux domestiques pour la production de l'antitoxine. Tous les animaux domestiques étaient, tour à tour, employés dans ce but et c'est ainsi que BARDACH et ARONSON se sont adressés aux chiens pour la préparation de sérum antidiphtérique. D'après ces auteurs, ces animaux sont capables de donner un sérum très actif.

Les moutons et surtout les chèvres sont employés dans le même but par BEHRING.

L'immunisation des femelles qui donnent beaucoup de lait comme les chèvres et les vaches, présentent un intérêt tout particulier parce que l'antitoxine passe dans le lait (EHRlich). Une vache en lactation bien immunisée est une source d'antitoxine (ROUX).

Les vaches en particulier sont utilisées par ROUX et NOCARD dans la préparation du sérum antidiphtérique. Ces animaux, comme les chèvres, sont très sensibles au poison diphtérique. Ils tombent quelquefois, même longtemps après le début de l'expérience, dans un état d'amaigrissement et de faiblesse extrême. Beaucoup d'entre elles succombent en cours d'immunisation à la suite d'une dose un peu forte de toxine (5 cc.),

ce qui rend l'immunisation de plus en plus difficile. A l'autopsie on trouve en particulier, chez ces animaux, des néphrites parenchymateuses des plus prononcées (Roux).

L'âne se prête mal à la préparation du sérum antitoxique.

Le cheval, en règle très générale, est l'animal auquel on s'adresse pour la préparation des sérums antitoxiques depuis les essais de M. Roux, et cela pour certaines raisons scientifiques et pratiques que voici : Le cheval est capable de fournir une grande quantité de sérum. Il se laisse immuniser plus facilement que les autres animaux, son sérum est inoffensif pour les animaux de laboratoire et aussi pour l'homme.

En outre, le cheval est l'animal le plus facile à manier. La finesse de sa peau et ses grosses jugulaires superficielles rendent très faciles les manipulations pratiques soit pour l'injection d'une grande quantité d'antigène sous la peau, soit pour la saignée et la prise de sang.

Recherches personnelles

Les différences d'aptitude pour la production de l'antitoxine tétanique chez le cobaye, le lapin et la poule

Nous avons étudié, à l'aide de l'anatoxine tétanique, la production de l'antitoxine tétanique chez trois espèces animales différentes : le cobaye, le lapin et la poule.

Nous avons choisi les espèces chez qui la sensibilité à la toxine tétanique est très différente d'une espèce à l'autre. Les cobayes, comme nous l'avons vu déjà, sont les animaux les plus sensibles à la toxine tétanique ; nous rappelons que 1/15.000 cc. d'une toxine très active tue, en quatre jours, un cobaye de 250 à 300 g.

Les lapins sont beaucoup moins sensibles au poison tétanique que les cobayes ; pour une toxine tétanique donnée la dose mortelle est 100 fois plus grande chez le lapin que chez le cobaye. Et enfin, les poules sont les animaux les plus résistants à cette toxine. Nous avons vu que la quantité de la toxine

tétanique nécessaire pour tuer cet animal est représentée par 700 à 1.000 doses mortelles de la même toxine pour le cobaye.

Manuel opératoire

A 25 cobayes, 5 lapins et 5 poules, nous avons injecté à trois reprises, séparées par un intervalle de 15 jours, de l'anatoxine tétanique. Le premier jour, 2 cc. ; quinze jours plus tard, 5 cc., et enfin, 10 cc. d'anatoxine, quinze jours après la 2^e injection.

Nous avons décelé la quantité d'antitoxine tétanique provoquée par les injections d'anatoxine dans le sang de ces animaux par trois fois une quinzaine de jours après chacune de ces trois injections d'anatoxine. Nous avons suivi ainsi la progression de la production de l'antitoxine pendant toute la durée de cette expérience afin de préciser l'aptitude de ces animaux d'espèces différentes, à la production de l'antitoxine.

L'anatoxine tétanique employée dans notre expérience est une anatoxine d'une bonne valeur antigène intrinsèque (dix unités).

Pour la prise de sang de nos animaux nous avons saigné les lapins par la veine marginale de l'oreille et les poules par la veine axillaire, quant aux cobayes nous nous sommes procuré du sang soit par la veine jugulaire mise à nu, soit, plus simplement, en sacrifiant chaque fois 3 à 5 de ces animaux.

Notre expérience s'est accomplie en trois temps successifs séparés par des intervalles de 15 jours, temps qui s'écoule entre deux injections d'anatoxine ou mieux entre deux saignées successives (les animaux sont réinjectés d'anatoxine en général le même jour ou le lendemain du jour où l'on a effectué la saignée).

Le dosage des sérums est effectué par la méthode *in vivo* en injectant au cobaye neuf des mélanges de dilution convenable du sérum et de la toxine, que nous expliquerons au cours de notre exposé.

Premier temps. — Nous avons injecté aux 25 cobayes, 5 lapins et 5 poules, 2 cc. de l'anatoxine tétanique. Quinze jours plus tard nous avons saigné les animaux : 3 cobayes, 3 lapins et 3 poules et comme la quantité d'antitoxine après ces quinze premiers jours est en général assez faible, et varie d'un animal à l'autre nous avons mélangé les sérums des animaux provenant d'une même espèce. Dans ce but nous avons recueilli dans un premier verre conique et stérile, les sérums de 3 cobayes et nous les avons mélangés intimement. La même opération est faite pour les sérums de lapins (dans un deuxième verre) et les sérums des poules (dans un troisième verre)

Dosage de l'antitoxine

Dans une série de quatre petits verres coniques et stériles contenant chacun 1 cc. de sérum de cobaye par exemple, on ajoute des quantités croissantes de la toxine tétanique, représentant successivement 2, 5, 10 et 100 doses mortelles. On complète dans tous les verres au même volume, soit 4 cc., avec de l'eau physiologique stérilisée. Au bout de quelques instants, on injecte successivement le contenu de chaque verre à un cobaye neuf du poids de 250 à 300 g., dans les muscles de la cuisse. On met ces animaux en observation.

L'opération est la même pour le sérum des lapins et le sérum des poules ; nous n'y reviendrons plus.

La dose minima mortelle (D. M. M.) de la toxine tétanique, employée dans nos expériences, étant 0,004 cc. pour avoir les 2, 5, 10 et 100 doses mortelles de cette toxine, nous avons préparé, d'après un simple calcul, les dilutions convenables correspondantes que voici.

1 D. M. M.	=	0 × 0,00025 = 0,00025	ou 1 cc. d'une dilution à 1/4000	
2	—	= 2 × 0,00025 = 0,0005	ou 1 cc.	— 1/2000
5	—	= 5 × 0,00025 = 0,00125	ou 1 cc.	— 1/800
10	—	= 10 × 0,00025 = 0,0025	ou 2 cc.	— 1/400
100	—	= 100 × 0,00025 = 0,025	ou 1 cc.	— 1/40

Dans un premier verre conique contenant 9 cc. d'eau salée, on introduit 1 cc. de la toxine en question que l'on agite fortement pour faire un mélange bien homogène ; c'est la solution A.

A 1 cc. de cette dilution A qui correspond à 1/10 cc. de la toxine initiale on ajoute, dans un verre stérile, 3 cc. de l'eau salée ; on aura ainsi la dilution à 1/40 dont 1 cc. correspond à 100 doses mortelles.

Dans un second verre conique contenant 9 cc. d'eau salée, on introduit 1 cc. de la dilution (A) et on agite de nouveau avec soin, c'est la solution (B).

A 1 cc. de cette dilution (B) qui correspond à 1/100 cc. de la toxine initiale, on ajoute, dans un verre stérile, 7 cc. d'eau salée. On aura ainsi la dilution 1/800 dont 1 cc. correspond à 5 et 2 cc. à 10 D. M. M.

Et enfin, dans un troisième verre conique contenant 19 cc. d'eau salée, on introduit 1 cc. de dilution (B) et on agite avec soin. C'est la dilution (C).

1 cc. de cette dilution (C) correspond à 1/2.000 de la toxine initiale, c'est-à-dire 2 doses mortelles.

Nous avons résumé toute cette opération dans le schéma suivant :

1 ^o Dil. A (1 cc. de la toxine + 9 cc. d'eau phys.)	1 cc. = 0,1 = 1/10
Dil. A' (1 cc. A + 3 cc. eau phys.)	1 cc. = 0,025 = 1/40 = 100 D.M.M.
2 ^o Dil. B (1 cc. A + 9 cc. eau phys.)	1 cc. = 0,01 = 1/100
Dil. B' (1 cc. B + 7 cc. eau phys.)	1 cc. = 0,00125 = 1/800 = 5 D.M.M.
	2 cc. = 0,0025 = 1/400 = 10 D.M.M.
3 ^o Dil. C (1 cc. B + 19 cc. eau phys.)	1 cc. = 0,0005 = 1/2000 = 2 D.M.M.

Les résultats obtenus d'après le dosage de sérum de ces trois groupes d'animaux sont rapportés dans le tableau suivant.

SÉRUM	TOXINE	N° DES COBAYES	RÉSULTATS
		D'ÉPREUVE	
Sérum de 3 cobayes (mélange)	1 cc.	2 D.M.	1 - 75
	1 cc.	5 D.M.	29 - 75 P. 36 h.
	1 cc.	10 D.M.	23 - 75 P. 24 h. M. après 3 j.
	1 cc.	100 D.M.	33 - 75 P. 24 h. M. après 2 j.
Sérum de 3 lapins (mélange)	1 cc.	2 D.M.	11 - 75 P. 36 h.
	1 cc.	5 D.M.	7 - 75 P. 24 h. M. après 3 j.
	1 cc.	10 D.M.	25 - 75 P. 24 h. M. après 3 j.
	1 cc.	100 D.M.	18 - 75 P. 24 h. M. après 2 j.
Sérum de 3 poules (mélange)	1 cc.	2 D.M.	9 - 75 P. 24 h. M. après 2 j.
	1 cc.	5 D.M.	26 - 75 P. 24 h. M. après 2 j.
	1 cc.	10 D.M.	36 - 75 P. 24 h. M. après 1 j.
	1 cc.	100 D.M.	31 - 75 P. 24 h. M. après 1 j.
	Tém.de 2 D.M.	32 - 75	P. 24 h. M. après 2 j.
	Tém.de 5 D.M.	4 - 75	P. 24 h. M. ap. 36 h.

D'après ces résultats on constate que le cobaye qui reçoit le mélange de 1 cc. de sérum de 3 cobayes (mélange) et de 2 doses mortelles de la toxine, ne présente aucune manifestation tétanique et au 4 jour se portait aussi bien qu'un cobaye neuf. 1 cc. de sérum de cobaye neutralise donc 2 doses mortelles de toxine ; ou bien, l'antitoxine, provoquée par l'injection préalable de 2 cc. d'anatoxine, dans l'organisme du cobaye est telle après 15 jours qu'un cc. de son sérum est capable de saturer deux doses mortelles de la toxine.

Le cobaye qui reçoit le mélange de 1 cc. de sérum + cinq D. M. M. n'est pas mort, lui non plus, mais il présente une paralysie partielle trente-six heures après l'injection du mélange ; cela veut dire que la quantité d'antitoxine présente dans le sang de nos cobayes injectés d'anatoxine est à peine suffisante pour neutraliser 5 doses mortelles de la toxine. C'est donc la limite de capacité de nos cobayes dans la production de l'antitoxine tétanique 15 jours après une injection de 2 cc. d'anatoxine.

Pour le sérum des lapins nous voyons qu'un seul cobaye d'épreuve est vivant, c'est celui qui a reçu le mélange de 1 cc.

avec deux doses mortelles. Les autres cobayes recevant le sérum des lapins avec 5, 10 et 100 doses mortelles de toxine sont morts.

La quantité de l'antitoxine préparée par l'organisme de lapins est donc un peu moindre que celle produite par l'organisme de cobaye.

Quant aux poules, l'expérience nous montre que cette dose d'anatoxine (2 cc.), qui est capable de provoquer, chez le lapin, une quantité d'antitoxine neutralisant deux doses mortelles, et chez le cobaye plus de 5 doses mortelles, n'est pas suffisante pour provoquer la moindre trace d'antitoxine dans l'organisme de la poule.

Rappelons que les cobayes témoins ayant reçu 2 et 5 doses mortelles sont morts tous les deux, 2 jours après l'injection de la toxine.

Deuxième temps. — Une deuxième injection de l'anatoxine tétanique, de 5 cc. est faite à tous les animaux de notre expérience le lendemain de la saignée.

Quinze jours après cette deuxième injection on saigne les animaux et on prélève le sérum en vue d'un nouveau dosage. La quantité d'antitoxine étant en général, nous le savons d'avance, assez considérable d'après cette deuxième injection pour que nous puissions la titrer dans le sérum de chaque animal séparément.

Dosage des sérums. — Dans une série de 4 verres stériles contenant chacun une quantité égale de la toxine représentant 100 D. M., on ajoute des quantités progressivement décroissantes de 1 cc., 1/3, 1/10 et 1/30 cc. de sérum de l'animal donné. On complète dans tous les verres au même volume soit 4 cc., avec l'eau physiologique. Au bout de quelques minutes, on injecte successivement le contenu de chaque verre à un cobaye neuf du poids de 250 à 300 g. dans les muscles de la cuisse. On met ces animaux en observation.

Nous avons déjà montré la préparation de la dilution de la

toxine dont 1 cc. correspond à 100 doses mortelles. Nous n'y reviendrons plus.

Quant aux dilutions convenables de sérum, le mieux est de faire, tout d'abord, une dilution à 1/10 (1 cc. de sérum + 9 cc. d'eau salée) après quoi nous aurons :

1 cc. de cette dilution correspond à 1/10 cc. de sérum ;

3,3 cc. correspondent à 1/3 cc. de sérum ;

1 cc. de cette dilution + 2 cc. d'eau salée donnent une dilution dont 1 cc. correspond à 1/30 cc. de sérum.

Les mêmes opérations seront recommencées autant de fois qu'il y a de sérums à titrer.

Le sérum de poule provenant de la première saignée ne contenant pas d'antitoxine nous avons pensée que cette fois il n'en renfermerait qu'une faible quantité. Aussi avons-nous ajouté aux dilutions de sérums de ces animaux 10 doses mortelles seulement.

Nous allons exposer en détail les résultats obtenus après ce nouveau dosage dans le tableau suivant :

Tableau II. — Dosage du sérum des cobayes ,

	SÉRUM	TOXINE	N° DES CORAYES	RÉSULTATS
			D'ÉPREUVE	
Sérum de cobaye 43-44	1 cc.	100 D.M.	46-81	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	39-81	—
	1/10 cc.	—	36-81	—
	1/30 cc.	—	38-81	—
Sérum de cobaye 65-66	1 cc.	100 D.M.	93-79	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	92-79	—
	1/10 cc.	—	88-79	—
	1/30 cc.	—	99-79	P. 36 h. M. après 2 j.
Sérum de cobaye 77-78	1 cc.	100 D.M.	96-81	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	41-81	—
	1/10 cc.	—	37-81	P. 48 h. M. après 4 j.
	1/30 cc.	—	30-81	P. 36 h. M. après 3 j.
Sérum de 3 cobayes précédents (mêlé)	1 cc.	100 D.M.	15-81	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	45-81	—
	1/10 cc.	—	19-81	—
	1/30 cc.	—	10-81	—

Tableau III. — Dosage du sérum des lapins

	SÉRUM	TOXINE	N° DES COBAYES	RÉSULTATS
			D'ÉPREUVE	
Sérum de lapin 6-7-64	1 cc.	100 D.M.	14-81	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	26-81	—
	1/10 cc.	—	9-81	—
	1/30 cc.	—	23-81	M. après 2 j.
Sérum de lapin 10-11-64	1 cc.	100 D.M.	8-81	Pas de symptôme tétan.
	1/3 cc.	—	29-81	—
	1/10 cc.	—	16-81	—
	1/30 cc.	—	20-81	—
Sérum de lapin 4-5-64	1 cc.	100 D.M.	35-81	—
	1/3 cc.	—	6-81	—
	1/10 cc.	—	33-81	—
	1/30 cc.	—	25-81	—
Sérum des 3 lapins précédents (mélangé)	1 cc.	100 D.M.	12-81	—
	1/3 cc.	—	13-81	—
	1/10 cc.	—	43-81	—
	1/30 cc.	—	7-81	—

Tableau IV. — Dosage du sérum des poules

Poule Bague verte G.	1 cc.	10 D.M.	48-81	P. 48 h.
	1/3 cc.	—	21-81	P. 24 h. M. après 3 j.
	1/10 cc.	—	2-81	P. 24 h. M. après 2 j.
	1/30 cc.	—	22-81	P. 24 h. M. après 2 j.
Poule Bague rouge G.	1 cc.	10 D.M.	24-81	P. 36 h. M. après 3 j.
	1/3 cc.	—	27-81	P. 36 h. M. après 3 j.
	1/10 cc.	—	17-81	P. 24 h. M. après 2 j.
	1/30 cc.	—	32-81	P. 24 h. M. après 2 j.
Poule Bague jaune D.	1 cc.	10 D.M.	18-81	P. 24 h. M. après 3 j.
	1/3 cc.	—	30-81	P. 24 h. M. après 2 j.
	1/10 cc.	—	28-81	P. 24 h. M. après 2 j.
	1/30 cc.	—	34-81	P. 24 h. M. après 2 j.
Témoins de 10 doses mortelles				Mort après 2 j.

D'après ces résultats nous constatons que :

1° La quantité d'antitoxine contenue dans le sang du cobaye est considérablement augmentée après cette 2° injection de sorte que 1/10 cc. de sérum est déjà capable de saturer 100

doses mortelles de la toxine, c'est-à-dire 1 cc. de sérum d'un cobaye recevant 2 injections successives à l'intervalle de quinze jours, une première fois de 2 cc. et une deuxième de 5 cc. d'anatoxine tétanique, est capable 15 jours après cette 2^e injection, de neutraliser 1.000 D. M. d'une toxine tuant le cobaye témoin en 2 jours.

On voit, en outre, dans ce tableau, une différence marquée entre les cobayes immunisés, en ce qui concerne la production de l'antitoxine. Par exemple, le cobaye qui reçoit le mélange de 1/10 cc. de sérum du cobaye immunisé 65-66 et 100 D. M. de la toxine n'a pas résisté à cette inoculation. Il est mort après trois jours.

De même les cobayes qui ont reçu les mélanges successifs de 1/10 et 1/30 cc. de sérum de cobaye immunisé 77-78 et 100 D. M. de la toxine n'ont pas supporté, eux non plus, ces inoculations. Ils sont morts trois jours après. Cela veut dire que la quantité d'antitoxine contenue dans 1/30 cc. de sérum de cobaye immunisé 65-66 et, dans 1/10 et 1/30 du sérum de cobaye 77-78, n'est pas suffisante pour neutraliser 100 D. M. de la toxine.

En effet, il ne faut pas oublier que si, pour une espèce donnée, le pouvoir immunisant est en relation directe avec la valeur antigène intrinsèque, il dépend aussi, comme nous l'avons déjà fait remarquer, de facteurs appartenant à l'animal, facteurs, qui se font particulièrement sentir lorsqu'on fait seulement une ou deux injections d'antigène. Dans ce cas l'immunité obtenue dans un même groupe d'animaux avec un même échantillon d'anatoxine peut varier dans les proportions de 1 à 2, à 5 et même plus, d'un animal à l'autre ; nous y reviendrons plus tard à propos de la question de l'individualité ;

2° Des résultats obtenus avec le sérum des lapins immunisés sont à peu près les mêmes que nous avons observés pour les cobayes ; nous n'étions pas prévenus, en effet, de la quantité considérable d'antitoxine qui peut se produire dans l'orga-

nisme de ces animaux après la deuxième injection. L'expérience nous montre très facilement que la quantité d'antitoxine contenue dans le sérum des cobayes et des lapins ainsi traités neutralisera beaucoup plus de la toxine que 1.000 D. M. par centicube. Le dosage que nous avons effectué pour ces sérums n'a pas révélé la limite de neutralisation du mélange toxine + antitoxine pour la plupart de ces animaux. Nous allons la mettre en évidence dans le troisième temps de notre expérience en poussant beaucoup plus loin les dilutions des sérums et celles de la toxine dans le dosage de ces sérums.

Nous faisons remarquer, ici aussi, la différence individuelle qui existe entre le lapin 6-7-64 et les autres lapins immunisés ; en effet, 1/30 cc. de sérum de ce lapin ne sature pas 1.000 D. M. de la toxine ; le cobaye neuf qui avait reçu ce mélange est mort après trois jours.

3°. Quant aux poules, le sang de ces animaux ne renferme pas encore la quantité suffisante d'antitoxine pour neutraliser 10 D. M. de la toxine par cc. de leur sérum.

La différence d'aptitude à la production d'antitoxine est ici très démonstrative. La poule (bague verte G.) est celle chez laquelle 1 cc. de son sérum neutralise 10 D. M.

Troisième temps. — Continuons l'injection de l'anatoxine chez nos animaux immunisés, nous avons fait pour la troisième et dernière fois une injection de 10 cc. de l'anatoxine tétanique à tous les animaux de notre expérience et nous les avons saignés quinze jours plus tard.

Dosage des sérums (En unité antitoxique). — Dans une série de verres coniques contenant chacun une quantité de la toxine représentant 1/10 L+, on ajoute les quantités progressivement décroissantes de 1/10, 1/30, 1/100 et 1/300 cc. d'un sérum donné, on complète à 4 cc. avec de l'eau physiologique et stérilisée ; on laisse les mélanges au repos pendant quelques minutes et on injecte la totalité de chacun d'eux dans les muscles de la cuisse d'un cobaye neuf, comme nous l'avons vu d'ailleurs pour les dosages précédents.

La définition de la dose L+ et la quantité de la toxine qui la correspond est déterminée dans le chapitre consacré au dosage de toxine à la fin de cet ouvrage. Rappelons ici seulement que cette dose de L+, pour notre toxine qui a une D.M.M.=0,00025, est égale à 0,058.

La quantité de sérum qui, mélangée au L+ de toxine, ne tue pas un cobaye de 250 à 300 grammes en moins de quatre jours, renferme une unité antitoxique (UA).

Dans un verre conique contenant 9,942 d'eau salée on introduit 0,058 de la toxine ; 1 cc. de cette dilution correspond donc à 1/10 L+ dont nous avons besoin pour notre dosage.

Voici maintenant les résultats obtenus après ce dernier dosage :

Tableau V. — Dosage du sérum des cobayes

	SÉRUM	TOXINE	N° DES COBAYES	RÉSULTATS
			D'ÉPREUVE	
Cobayes 85-86-63	{	1/10 cc. 1/10 L+	20-87	Pas de symptôme tétan.
		1/30 cc. —	27-87	—
		1/100 cc. —	49-87	—
		1/300 cc. —	51-87	—
Cobayes 55-56-63	{	1/10 cc. 1/10 L+	59-87	—
		1/30 cc. —	45-87	M. après 5 j.
		1/100 cc. —	17-87	P. 24 h. M. après 2 j.
		1/300 cc. —	32-87	P. 24 h. M. après 1 j.
Cobayes 81-82-63	{	1/10 cc. 1/10 L+	52-87	
		1/30 cc. —	61-87	
		1/100 cc. —	64-87	P. 26 h. M. après 3 j.
		1/300 cc. —	62-87	P. 24 h. M. après 1 j.
Mélanges de sérum/ des cobayes	{	1/10 cc. 1/10 L+	14-87	
		1/30 cc. —	22-87	
		1/100 cc. —	63-87	
		1/300 cc. —	31-87	P. 26 h.
		1/1000 cc. —	15-87	P. 24 h. M. après 2 j.

Tableau VI. — Dosage du sérum des lapins

	SÉRUM	TOXINE	N° DES COBAYES	RÉSULTATS
			D'ÉPREUVE	
Lapins 6-7-64	1/30 cc.	1/10 L+	58-87	
	1/100 cc.	—	42-87	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/300 cc.	—	39-87	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/1000 cc.	—	44	P. 24 h. M. après 1 j.
Lapins 10-11-64	1/30 cc.	1/10 L+	54-87	
	1/100 cc.	—	60	P. 24 h. M. après 2 j.
	1/300 cc.	—	25	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/1000 cc.	—	47	P. 24 h. M. après 1 j.
Lapins 4-5-64	1/30 cc.	1/10 L+	24-87	P. 36 h.
	1/100 cc.	—	28	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/300 cc.	—	40	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/1000 cc.	—	23	P. 24 h. M. après 1 j.
Mélange de sérum des lapins 1-2-64 8-9-64	1/30 cc.	1/10 L+	18-87	
	1/100 cc.	—	55	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/300 cc.	—	37	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/1000 cc.	—	30	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/3000 cc.	—	13	P. 24 h. M. après 2 j.

Tableau VII. — Dosage du sérum des poules

Poule Bague verte G.	1/3 cc.	10 D. M.	35-87	
	1/10 cc.	—	21	M. après 6 j.
	1/30 cc.	—	48	P. 36 h. M. après 3 j.
	1/100 cc.	—	38	P. 24 h. M. après 2 j.
Poule Bague rouge G.	1/3cc.	10 D. M.	26-87	
	1/10 cc.	—	29	M. après 4 j.
	1/30 cc.	—	34	P. 26 h. M. après 3 j.
	1/100 cc.	—	50	P. 24 h. M. après 2 j.
Poule Bague jaune D.	1/3 cc.	10 D. M.	36-87	P. 26 h. M. après 3 j.
	1/10 cc.	—	19	P. 26 h. M. après 1 j.
	1/30 cc.	—	33	P. 24 h. M. après 1 j.
	1/100 cc.	—	41	P. 24 h. M. après 1 j.
Sérum de 5 poules (Mélange)	1/3 cc.	10 D. M.	53-87	
	1/10 cc.	—	16	
	1/30 cc.	—	58	
	1/100 cc.	—	43	P. 24 h. M. après 2 j.
Témoins	De 10 D. M.	46-87		P. 24 h. M. après 1 j.

D'après les résultats énumérés dans ce tableau on constate que :

1° La quantité d'antitoxine produite par trois injections successives de 2,5 et 10 cc. d'anatoxine dans l'organisme du cobaye est telle que 1/100 cc. de son sérum est capable de neutraliser 1/10 L+ de la toxine, c'est-à-dire 1 cc. de ce sérum neutralise 10 L+ ; notre sérum a donc, d'après d'EURLICH, une valeur de dix unités antitoxiques (10 UA) par cc.

Un de nos cobayes (le numéro 85-86-63) est arrivé à donner un sérum de 30 UA par cc. ; mais il s'agit ici de la capacité individuelle de cet animal. On peut dire, qu'en règle générale, le cobaye est capable de produire, après trois injections successives d'anatoxine, un sérum d'une valeur antitoxique entre 5 et 10 UA.

2° La quantité d'antitoxine révélée dans le sérum des lapins après les mêmes injections est un peu moindre que celle des cobayes. On peut dire que l'aptitude des cobayes à la production de l'antitoxine est un peu plus grande que celle des lapins.

3° La production d'antitoxine est très lente chez les poules, sa quantité n'est pas considérable ; à peine 1 cc. de leur sérum arrive, après ces trois injections d'anatoxine, à neutraliser 100 D.M.

La différence individuelle est très marquée chez cet animal ; par exemple, la poule (bague jaune D) n'a pas encore préparé une quantité d'antitoxine capable de neutraliser quelques doses mortelles de la toxine, tandis que la poule (bague verte G) a donné un sérum neutralisant 10 D.M. par cc. et ainsi de suite.

CONCLUSIONS

I. — Les animaux d'espèce différente, tels le cobaye, le lapin et la poule, ont une aptitude différente à la production de l'antitoxine tétanique ; les cobayes, animaux plus sensibles à la

toxine tétanique, ont une aptitude plus grande à la production d'antitoxine tétanique. La quantité de cette antitoxine provoquée dans l'organisme du cobaye, après trois injections de 2,5 et 10 cc. d'anatoxine tétanique, par intervalles de quinze jours, dépasse, quinze jours après la dernière injection, une dizaine et même une trentaine d'unités antitoxiques par cc.

La quantité d'antitoxine préparée par l'organisme du lapin avec les mêmes doses d'anatoxine, injectées dans le même ordre et avec les mêmes intervalles que chez les cobayes est, en général, moindre que la quantité d'antitoxine présente dans le sang de ces derniers animaux ; elle est à peine supérieure, chez le lapin, à 10 UA par cc. et n'arrive jamais, dans notre expérience, à une valeur de 30 UA par cc.

II. — La poule, animal naturellement réfractaire à la toxine tétanique, mais qui peut devenir sensible expérimentalement, est capable de produire de l'antitoxine. Mais son aptitude à produire de l'antitoxine est très loin d'être la même que celle du lapin et du cobaye.

La production de l'antitoxine dans l'organisme de la poule est lente. L'antitoxine tétanique décelée dans le sang de cet animal, après trois injections d'anatoxine tétanique, n'est pas encore suffisante pour neutraliser 10 et peut-être beaucoup moins, de doses mortelles de la toxine.

III. — Il y a une différence individuelle marquée en ce qui concerne la production de l'antitoxine tétanique, dans une espèce donnée. La quantité d'antitoxine obtenue dans un même groupe d'animaux et avec un même échantillon d'anatoxine peut varier dans les proportions de 1 à 2 et même beaucoup plus, d'un animal à l'autre.

3° *L'individualité des animaux*

Dans les expériences que nous venons d'effectuer à propos de l'aptitude des différentes espèces animales à la production de l'antitoxine, nous avons fait remarquer à maintes reprises la différence individuelle qui existe entre les animaux de la même espèce dans la production de l'antitoxine. Nous devons ajouter en particulier que cette différence individuelle est plus prononcée chez le cobaye que chez les lapins et elle se fait surtout sentir lorsqu'on fait seulement une ou deux injections d'antigène.

En effet, sur trois cobayes nous avons effectué le dosage de l'antitoxine quinze jours après une deuxième injection de 5 cc. (voir page 83, tableau II) ; nous avons remarqué une différence très marquée entre le sérum de ces trois animaux en ce qui concerne la richesse de l'antitoxine dans le sang : le cobaye 43-44 est très apte à la production de l'antitoxine. 1 cc. de son sérum est capable, quinze jours après la deuxième injection, de neutraliser plus de 3.000 doses mortelles de la toxine tétanique ; le cobaye 65-66, tout en donnant un bon sérum relativement riche en antitoxine (il neutralise 1.000 D. M. par cc.), n'arrive cependant pas à neutraliser 3.000 D. M. par cc. Et, enfin, le dernier cobaye 77-78, qui a reçu la même quantité d'anatoxine, suivant le même ordre et avec les mêmes intervalles (15 jours) entre les deux injections, n'a pu produire une quantité suffisante d'antitoxine pour neutraliser 1.000 D. M.

De tout ceci, il ressort qu'avec une dose déterminée d'un même antigène spécifique, avec les mêmes intervalles, le même mode d'inoculation et enfin la même durée d'immunisation, les animaux appartenant à la même espèce se montrent plus ou moins aptes à la production de l'antitoxine.

Cette différence individuelle, qui dépend sans doute des facteurs appartenant en propre à l'animal, a été observée chez les autres espèces, en particulier le cheval. C'est à cet animal,

qu'en règle très générale, on s'adresse pour la préparation des sérums antitoxiques. Depuis le début de la sérothérapie, on s'est donc efforcé de rechercher les facteurs appartenant en propre à cet animal et qui, chez lui, sont susceptibles d'influencer la production des antitoxines. C'est ainsi que l'on a étudié à nombre de reprises le rôle de la race, du sexe, du tempérament, de l'âge, etc., etc. Les résultats de ces études ont été très variables suivant les expérimentateurs. Nous allons voir que les facteurs de race, d'origine, de sexe, de tempérament (lymphatique, nerveux, sanguin, etc.), de genre de vie (stabilisation, travail) etc., etc., n'ont qu'une influence toute relative, sinon nulle, sur l'élaboration des antitoxines par le cheval.

Cependant, il y a des facteurs relevant de l'animal qui ont retenu l'attention d'un grand nombre d'expérimentateurs désireux d'utiliser ces facteurs dans la préparation du sérum antitoxique. L'un de ces facteurs, connu depuis longtemps et que l'on a cherché à mettre en œuvre durant ces dernières années dans la préparation du sérum antidiphthérique, est la possession par nombre de chevaux (neufs), d'une immunité « naturelle » ou plus exactement d'origine occulte vis-à-vis de l'intoxication diphthérique.

Il y a un autre facteur propre à l'animal qui est connu seulement depuis quelques années et qui a fait l'objet de nombreuses recherches, surtout dans ces dernières années, c'est le groupe sanguin.

Les groupes sanguins, connus d'abord chez l'homme, ont trouvé, chez cette espèce, une extension considérable dans l'application pratique de divers laboratoires de sérologie, médecine légale, etc., etc. Ce n'est que depuis peu de temps qu'on a commencé à l'étudier chez les animaux.

On cherche actuellement, en ce qui concerne les groupes sanguins chez le cheval, à connaître les rapports qui existent entre cette propriété particulière du sang et la production de l'antitoxine spécifique.

Nous étudierons nous-même, en premier lieu, l'immunité

d'origine occulte chez le cheval, à l'intoxication diphtérique, c'est-à-dire les chevaux à réaction de Schick positive et négative et, ensuite, la question des groupes sanguins chez cet animal, comme deux facteurs principaux de l'individualité de l'animal.

A). — De l'immunité d'origine occulte chez le cheval vis-à-vis de l'intoxication diphtérique

Déjà, il y a près de quarante ans, ROUX, NOCARD et L. MARTIN avaient constaté la présence d'antitoxine diphtérique dans le sang de certains chevaux avant toute immunisation artificielle. Depuis, la possibilité de mettre en œuvre, chez le cheval, une épreuve analogue à celle de SCHICK chez l'homme, a permis de déceler facilement les animaux possédant une immunité spécifique d'origine occulte.

On a cherché, durant ces dernières années, à utiliser ce facteur relevant de l'animal, dans la préparation du sérum antidiphtérique.

C'est ainsi que certains auteurs ont signalé que de tels animaux se montrent plus facilement aptes à la production de l'antitoxine diphtérique et fournissent des sérums plus riches en antitoxine que les chevaux n'ayant pas d'immunité « naturelle ».

Aussi, certains laboratoires sélectionnent leurs chevaux et n'utilisent pour la préparation du sérum antidiphtérique que des animaux possédant une immunité spécifique « naturelle ».

Nombreuses sont les recherches effectuées dans ce sens, l'expérimentation la plus démonstrative est celle de M. RAMON faite il y a deux ans sur une centaine de chevaux.

Voyons tout d'abord en quoi consiste la réaction de SCHICK.

La réaction de SCHICK est une intradermo-réaction capable de dépister le phénomène de l'immunité dans la diphtérie.

MARX, ROMER et SAMES ont vu, les premiers, que l'injection sous-cutanée ou intra-dermique d'un mélange de toxine et de sérum humain contenant de l'antitoxine, chez le cobaye, n'est suivie d'aucune modification des téguments lorsque la quantité d'antitoxine est suffisante ; en dehors de ces conditions, la toxine diluée donne de la rougeur et de l'œdème.

ABEL, WASSERMANN, SCHMIDT et PFLANZ, FISCHL et WUNSCHHEIM avaient constaté, antérieurement, que la protection naturelle contre la diphtérie était due à la présence, dans le sérum des sujets, d'une dose minime d'antitoxine.

MARX avait pu établir que cette dose d'antitoxine des sujets naturellement immunisés était de 1/20 d'unité antitoxique par cc.

MICHIELS et SCHICK arrivent enfin à perfectionner ces techniques de titrage. Ils ont étudié l'effet de l'injection intra-dermique à l'homme de la toxine seule, très diluée. Ils ont pu établir ainsi que les sujets ayant de l'antitoxine dans leur sang (immunité naturelle) ne réagissent point à l'injection de toxine.

Par contre les sujets qui n'ont point de l'antitoxine dans leur sang réagissent à cette injection.

Cette injection intra-dermique de toxine qui permet de reconnaître les sujets sensibles (réaction positive) ou ceux qui possèdent une immunité naturelle (réaction négative), est connue en pratique sous le nom de réaction de SCHICK.

La valeur de la réaction ne fait plus de doute aujourd'hui chez l'homme.

L'épreuve de SCHICK chez le cheval. — On injecte dans le derme de l'encolure une quantité de toxine représentant une dose mortelle pour le cobaye (la dose de toxine pour une épreuve de SCHICK, chez l'homme, est de 1/50 de la dose minima mortelle pour le cobaye).

Le sens de l'épreuve de SCHICK chez le cheval. Réaction négative. — On n'observe aucune modification des téguments. Cette réaction indique que l'animal a une immunité naturelle.

Des saignées d'épreuve et des dosages d'antitoxine diphté-

rique ont montré que les sérums de chevaux présentant cette réaction de SCHICK négative, ne renferment au maximum que 1/20 d'unité d'EHRlich (RAMON).

Réaction positive. — Elle se traduit à l'endroit de l'injection, par une zone de tuméfaction très nette, apparaissant dans les 24 à 48 heures après l'injection et persistant 7 à 10 jours.

Il y a une concordance exacte entre le taux d'antitoxine et le sens de l'épreuve de SCHICK, chez le cheval (RAMON).

Le sens de réaction de SCHICK et la production de l'antitoxine diphtérique chez le cheval. — Les chevaux qui ne possèdent pas une immunité naturelle prononcée (les chevaux à SCHICK positif) sont aussi aptes à la production de l'antitoxine diphtérique que les chevaux possédant une immunité spécifique naturelle relativement forte (les chevaux à SCHICK négatif) (RAMON).

L'expérience a porté sur 100 chevaux.

Avant toute autre intervention ces chevaux étaient soumis à l'épreuve de SCHICK afin de connaître les animaux possédant déjà un rudiment d'immunité et ceux n'en possédant pas.

L'immunisation et l'hyperimmunisation sont effectuées avec l'anatoxine diphtérique chez les uns comme chez les autres.

L'apparition et la progression de l'antitoxine diphtérique sont étudiées, chez tous ces animaux, au moyen de la méthode de la floculation.

Les chevaux étaient soumis à des injections de doses progressivement croissantes (20, 35, 60, 100, 150, 200, 300, 400 cc.) d'anatoxine diphtérique d'une valeur antigène intrinsèque de 10 à 12 unités.

Dix jours après la dernière injection, les sérums des chevaux à SCHICK négatif ont un pouvoir antitoxique en général plus élevé que celui des chevaux à SCHICK positif.

La valeur des sérums à la fin de l'hyperimmunisation s'est révélée sensiblement la même chez les chevaux qui avaient présenté avant la première injection d'anatoxine une réaction de SCHICK négative et chez ceux dont la réaction avait été positive. Mais chez les premiers de ces animaux, l'apparition et

l'accroissement de l'antitoxine étaient en général plus rapide que chez les derniers ; ainsi par exemple chez certains des chevaux offrant un Schick positif à l'origine, l'antitoxine n'apparaît en quantité notable qu'après la seconde ou même après la troisième injection d'anatoxine.

Ce qui, en somme, au point de vue production d'antitoxine diphtérique différencie les deux catégories d'animaux que nous avait désignées l'épreuve de Schick, c'est la vitesse avec laquelle les sérums atteignent le maximum de leur pouvoir antitoxique. La capacité moyenne de production à la fin de l'hyperimmunisation est équivalente dans l'une et l'autre de ces catégories et les différences qui peuvent exister initialement sont finalement nivelées par l'utilisation d'un antigène tel que l'anatoxine. (RAMON).

En résumé, l'immunité d'origine occulte du cheval n'a pas une grande influence sur l'élaboration des antitoxines chez cet animal ; les chevaux qui possèdent cette immunité naturelle se différencient de ceux qui ne l'ont pas, par la vitesse avec laquelle les sérums atteignent le maxima de leur pouvoir antitoxique.

Cette vitesse est beaucoup plus grande chez les animaux qui ont une certaine immunité naturelle (chevaux à réaction de Schick négative).

A la fin de la période de l'hyper-immunisation, la capacité moyenne de la production d'antitoxine est la même dans l'une et l'autre catégorie.

B. — Le phénomène d'iso-agglutination et les groupes sanguins.

Généralités. — Quand le sérum d'un individu d'une espèce donnée agglutine, dans certaines conditions, les hématies d'un autre individu mais de la même espèce, on dit qu'il y a hémiso-agglutination ou simplement iso-agglutination.

L'hétéro-agglutination qui consiste dans l'agglutination des hématies d'un animal par le sérum des animaux d'espèces différentes est un fait connu depuis assez longtemps (LANDOIS, 1874) comme étant la propriété de certains sérums normaux.

Par contre, l'iso-agglutination est un phénomène qui a été précisé beaucoup plus récemment (1900). On le connaît au jourd'hui, chez l'homme au moins, comme la principale des réactions d'individualité du sang normal (LATTES). Son étude est très avancée chez l'homme. D'abord observés comme un phénomène banal dans certains cas pathologiques, ensuite comme une simple curiosité scientifique, le phénomène d'iso-agglutination est entré actuellement dans la pratique courante des laboratoires. On l'a appliqué d'abord dans la transfusion sanguine, on le discute aujourd'hui en médecine légale dans l'hérédité, la paternité et dans les cas judiciaires.

Il paraît, selon FURUHATA, que le phénomène d'iso-agglutination avait été connu dans l'antiquité par les chinois qui l'utilisaient dans la médecine légale pour établir la parenté. (Un traité, en 4 volumes, Sen-en-Roku daté de 1247.)

Les groupes sanguins chez l'homme. — SHATTOCK (1900), et ensuite LANDSTEINER (1901) sont les premiers qui ont publié des observations certaines sur la présence d'iso-agglutination pour le sang de certains malades.

Le fait que ce phénomène avait été d'abord observé chez des malades contribua à donner une direction erronée aux recherches : en effet, longtemps après la découverte de ce phénomène, on ne le cherchait que chez les malades en

essayant, mais en vain, de montrer un rapport avec des maladies et une valeur diagnostique à la réaction d'agglutination.

C'est LANDSTEINER qui montra, le premier, l'existence régulière du pouvoir d'iso-agglutination dans le sérum normal. Il définit trois groupes chez l'homme, mais plus tard (1907) JANSKY montra un quatrième groupe et la possibilité de diviser les êtres humains en quatre groupes suivant leur inter-agglutination ;

Voici un schéma des groupes d'iso-agglutination selon JANSKY :

	I	II	III	IV
IV	+	+	+	—
III	+	+	—	—
II	+	—	+	—
I	—	—	—	—

Explications :

Groupe I	Leur sérum agglutine les hématies des groupes II, III et IV. Les hématies ne sont agglutinées par aucun sérum.
Groupe II	Leur sérum agglutine les hématies III et IV. Leurs hématies sont agglutinées par les sérums I et III.
Groupe III	Leur sérum agglutine les hématies II et IV. Leurs hématies sont agglutinées par I et III.
Groupe IV	Leur sérum n'agglutine aucune hématie. Leurs hématies sont agglutinées par les sérums de groupes II, III et I.

Moss, en 1910, reprit le travail et, indépendamment du fait établi par JANSKY, montra, lui aussi, l'existence de quatre groupes différents chez l'homme. Ses groupes ont été arbitrairement numérotés et il est actuellement classique de les désigner par les chiffres romains I, II, III, IV.

Voici un tableau des groupes d'iso-agglutination selon Moss.

	I	II	III	IV
IV	—	—	—	—
III	—	+	—	+
II	—	—	+	+
I	—	+	+	+

En comparant le tableau ci-dessus avec le schéma de JANSKY on se rend compte que ces deux tableaux diffèrent seulement par la numération inverse des groupes I et IV ; mais cette inversion a provoqué de nombreuses et ennuyeuses confusions dans la comparaison des travaux des différents auteurs.

Cette confusion vient de ce que certains auteurs suivent la numération de JANSKY et certains autres celle de MOSS.

Pour éviter cette confusion, V. DUNGERN-HIRSZFELD ont proposé d'ajouter au chiffre l'indication des symboles alphabétiques des agglutines et agglutinogènes.

La commission internationale pour l'étude des groupes sanguins qui s'est tenue à Paris le 15 juillet 1929, a adopté que la nomenclature A, B, AB, O doit être adaptée à l'exclusion de toute autre.

Et depuis, dans la pratique courante, le plus grand nombre d'expérimentateurs suivent la nomenclature ci-dessus accompagnée ou non, de chiffres romains.

Dans les recherches personnelles que nous avons effectuées chez le cheval et que nous allons exposer plus loin, nous avons suivi la nomenclature adoptée par la commission internationale qui est la plus simple et qui a l'avantage d'éviter toute confusion en rappelant les deux propriétés sanguines de chaque groupe. Le tableau suivant montre la correspondance entre les trois classifications :

V. DUNGERN HIRSZFELD	JANSKY	MOSS
A	II	II
B	III	III
AB	IV	I
O	I	IV

L'explication théorique des groupes sanguins.

On admet aujourd'hui, avec LANDSTEINER et avec HIRSZFELD, l'existence de deux agglutinogènes (dans les hématies) et deux

agglutines (dans le sérum) ; les deux agglutinogènes sont désignés par A et B et les agglutines par α et β .

On obtient ainsi pour les 4 groupes le schéma suivant :

Les groupes selon Moss	Agglutinogènes	Agglutinine
I	AB	—
II	A	β
III	B	α
IV	—	$\alpha + \beta$

La loi de Landsteiner montre l'existence de deux propriétés fondamentales des hématies A et B à l'état normal. Les sérums contiennent l'anticorps B, (β) si les hématies contiennent A et l'anticorps A, (α) si les hématies contiennent B. Si les hématies ne possèdent ni A ni B (Groupe O), nous trouvons dans le sérum des anticorps A et B ($\alpha + \beta$).

La démonstration de l'exactitude de ce schéma a été fournie par les expériences d'absorption électives pratiquées d'abord par Landsteiner et ensuite par un grand nombre d'expérimentateurs. On a constaté, par exemple, que les hématies du groupe A en contact avec le sérum ($\alpha + \beta$) lui enlève seulement l'agglutinine α ; celle du groupe B seulement l'agglutinine β ; celle du groupe AB les deux à la fois, etc., etc.

Ce qui compte essentiellement pour individualiser un sang, c'est l'agglutination ; car il s'agit là d'une propriété primitive héréditaire et invariable. Au contraire, l'agglutinine se développe en deuxième lieu et l'intensité de son action dépend de beaucoup de circonstances extérieures (LATTES).

Les propriétés de groupe ne sont pas limitées au sang. On a constaté la présence d'iso-agglutinine identique à celle du sang, dans le suc de tissu (LENART-KONIG), dans le lait et le colostrum, dans le liquide céphalorachidien ainsi que dans les transudats et les exsudats.

Le groupe sanguin est un caractère individuel fixe de chaque être humain qui ne peut être modifié ni par le temps, ni par les maladies intercurrentes ; cependant il est actuellement cer-

tain que chez le nouveau-né et le nourrisson, le pouvoir d'iso-agglutination est beaucoup moins fréquent que chez l'adulte.

Le taux de l'agglutinine dans le sérum est très variable ; aussi doit-on employer des techniques très précises et sensibles pour la mettre en évidence dans le sérum dans lequel cette agglutinine est à un taux très minime, sans quoi on s'expose à des erreurs sérieuses dans la détermination de ces groupes.

Les recherches plus récentes de DUJARRIC et KOSSOWITCH montrent que :

1° L'hémoglobine ne joue aucun rôle dans la réaction de l'agglutination ; sa présence est indifférente ; son absence dans le stroma n'empêche pas l'agglutination de se produire ;

2° Les agglutinogènes A et B sont fixées sur le stroma et tout se passe avec le stroma comme avec le globule entier (sauf la diminution du taux d'agglutination). Les stromas des globules rouges A et B sont agglutinés respectivement par les sérums et ceux du groupe AB sont agglutinés à la fois par les deux sérums, ceux du groupe O n'ont jamais donné d'agglutination.

Technique. — La réaction d'iso-agglutination se fait en mélangeant un sérum agglutinant avec des hématies et en observant l'agglutination. Les deux méthodes les plus pratiques et les plus connues sont la méthode de BETH-VINCENT et celle de DUNCERN-HIRSZFELD. Dans la méthode de BETH-VINCENT, on mélange en proportion déterminée du sérum et des hématies sur une même lame. Au bout de 2 à 3 minutes, on constate, lorsqu'il y a agglutination, que les globules rouges se mettent en amas irréguliers et le liquide devient parfaitement limpide ; s'il n'y a pas agglutination, le mélange reste homogène.

La méthode de DUNCERN-HIRSZFELD est basée sur le même principe, mais l'agglutination se fait dans les tubes. On recueille quelques gouttes de sang (2 à 3) dans chacun des 2 tubes à essai où se trouve déjà 0.5 et 1 cc. d'un mélange à 1/9 d'une solution à 2 % de citrate de soude et d'eau physiologique, on met alors quelques gouttes de sang dans chaque tube, on mélange bien et on les laisse pendant quelques heures à la

température ordinaire ; on lit le résultat après ce laps de temps.

On peut arriver à déterminer très facilement à quel groupe appartient un sang donné si on a à sa disposition du sérum étalon II et III.

	IV	III	II	I
I	+	+	+	— (AB)
II	+	+	—	— (A)
III	+	—	+	— (B)
IV	—	—	—	— (O)

En effet, d'après ce tableau, on peut conclure facilement que pour un sang donné :

Si les hématies sont agglutinées par les sérums II et III le sang appartient au groupe (AB) I.

Si les hématies sont agglutinées par le sérum III, le sang appartient au groupe (A) II.

Si les hématies sont agglutinées par le sérum II, le sang appartient au groupe (B) III.

Et si enfin les hématies ne sont agglutinées ni par le sérum II ni par le sérum III, le sang appartient au groupe (O) IV.

Quand on n'a pas à sa disposition les sérums étalons II et III, on déterminera les groupes en faisant agir les hématies d'un certain nombre de sangs (par exemple 10) sur les sérums des mêmes sangs ; c'est la même opération que nous avons effectuée dans nos recherches de groupes sanguins chez le cheval et que nous exposerons plus loin.

· ISO-AGGLUTINATION CHEZ LES ANIMAUX

HEKTOEN LUDWIG (1907), en étudiant le phénomène d'iso-agglutination chez un grand nombre d'animaux d'espèce différente : le cheval, le chien, le cobaye et le bœuf, n'a pu mettre en évidence la moindre trace de phénomène d'iso-agglutination chez les animaux.

Ce n'est que plus tard, en 1910, que DUNGERN et HIRSZFELD ont montré l'existence de ce phénomène chez les chiens.

Ces auteurs, inspirés des recherches d'EHRlich-MORGENROTH sur les chèvres, ont injecté dans des chiens le sang d'autres chiens et ils sont arrivés ainsi à montrer des immuno-iso-agglutinations chez les animaux.

En 1911, OTTENBERG-FRIEDMANN avaient cru reconnaître chez les lapins des groupes assez bien définis mais plus tardifs et ont dû abandonner cette opinion.

Ces mêmes auteurs réussirent à distinguer, un peu plus tard, trois groupes définis chez les bœufs.

BIALOSUKNIA-HIRSZFELD constatèrent en 1924 les trois groupes définis A, B et O chez les moutons ; SZMANOWSKI-STETKIEWIEZ-WACHLER montrent les mêmes groupes chez les porcs (1926).

De nombreuses observations viennent ensuite montrer l'existence de phénomènes iso-agglutination chez toute une série d'espèce animale : cheval, bœuf, rat, chat, chien, mouton, mulet, singe, lapin, cobaye, souris, les oiseaux et même les animaux à sang froid. Mais disons en passant qu'il y a encore des auteurs comme ROHDENBERG, SNYDER, LAMBERT et WALSH qui ne croient pas encore à une vraie iso-agglutination ni chez le rat ni chez le lapin, ni chez le cheval, où on l'avait précédemment signalé.

Parmi les animaux domestiques, le cheval est en particulier l'animal chez lequel le phénomène d'iso-agglutination est le mieux étudié.

WESEKY et ensuite KLEIN sont les premiers qui ont constaté

l'existence du phénomène d'iso-agglutination chez le cheval. PANISSET-VERGE, en 1922, en étudiant la question des « donneurs de sang en médecine vétérinaire », ont montré que le phénomène d'iso-agglutination est rarement observé chez le cheval et il est impossible de différencier certains groupes définis analogues à ceux de l'homme.

HIRSZFELD et PSZEMSKI reprirent ces recherches en 1923 et ont fait une étude plus complète en signalant la présence des propriétés A et B des hématies de cet animal.

D'après ces auteurs, il existe chez le cheval comme chez l'homme les deux éléments A et B mais en proportion tout à fait différentes. Pour 100 chevaux examinés par ces auteurs, on trouvera 55 % qui appartiennent au groupe A, 15 % seulement au groupe B et le reste dans un troisième groupe dont le sang ne renferme ni A ni B (O). Mais l'agglutinogène A n'accompagne pas toujours anti B (α), seulement dans le 15 % de groupe A on trouvera anti B (α). De même l'anti A (β) n'est pas toujours accompagné de B mais seulement 60 %.

Dans le groupe O où A et B manquent on trouve anti A (β) dans tous les sangs tandis que l'anti B (α) ne se trouve que dans la moitié.

SCHWARTZ et ensuite NOSENGO confirmèrent les données par HIRSZFELD et signalèrent l'existence des groupes analogues à ceux de l'homme quoique mal défini.

Plus récemment, DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et KOSSOVITCH ont pu déterminer 4 groupes sanguins chez le cheval comme chez l'homme. Pour ces auteurs :

A = 32 %	AB = 39 %
B = 16 %	O = 13 %

ni agglutinine ni agglutinogène 4 cas.

En outre, ces auteurs ont montré la difficulté de mettre en évidence un rapport entre la variété de groupe sanguin et le pouvoir antitoxique du sérum.

De tout ceci il résulte que les iso-agglutinines animales sont

très faibles et inconstantes et peut-être aussi variables, de sorte qu'il est difficile de baser sur elles des groupements clairs. D'autre part l'étude des groupes sanguins chez les animaux présente un intérêt théorique et pratique : identification zoologique, rapprochement entre les espèces, mais aussi vérification du pédigrée (hérédité des groupes sanguins) de certains animaux de luxe (chevaux de course, chiens de luxe), etc., etc.

Recherches personnelles

Nous avons vu, en ce qui concerne le phénomène d'iso-agglutination chez le cheval, que WESEKY, KLEIN, PANISSET et nombre d'auteurs ont montré le phénomène de l'iso-agglutination chez cet animal et que L. HIRZFELD avait signalé, le premier, la présence de propriétés A et B des hématies de cet animal.

Le rapport entre le groupe sanguin et la production de l'antitoxine est étudié, comme nous l'avons vu d'ailleurs, par DEJARRIC-KOSSOVITCH, qui ont montré la difficulté de mettre en évidence un rapport entre la variété des groupes sanguins et le pouvoir antitoxique du sérum.

Mais aucun de ces auteurs n'a cherché à vérifier si le phénomène d'iso-agglutination, aujourd'hui incontestablement présent dans le sang du cheval, est une propriété fixe du sang de cet animal comme cela a été démontré pour le sang de l'homme. On peut se demander aussi si les maladies morbides et spécifiques de cet animal, les interventions passagères de vaccination, immunisation, ou les interventions plus profondes, comme celle de l'hyperimmunisation antitoxique, par exemple, n'ont pas une influence quelconque sur le phénomène d'iso-agglutination du cheval.

Nous nous sommes proposé d'étudier la valeur et la fixité de ce phénomène d'iso-agglutination en premier lieu, chez les chevaux normaux destinés à l'hyperimmunisation antitoxique et ensuite chez les chevaux producteurs de sérum.

Les chevaux normaux que nous avons examinés étaient destinés soit à l'hyperimmunisation antidiphtérique, soit à l'hyperimmunisation antitétanique. Le phénomène d'iso-agglutination a été étudié avant et après l'hyperimmunisation ; nous cherchions par là à nous rendre compte si un changement de groupe peut survenir du fait de l'hyperimmunisation et si ce changement peut suivre une règle définie.

Dans une autre série d'expériences nous avons étudié ce phénomène chez les chevaux hyperimmunisés et producteurs du sérum antitoxique. Nous avons examiné le sang de ces animaux à deux reprises différentes, à deux mois d'intervalle, dans le but de savoir s'il peut se produire une variation du phénomène d'iso-agglutination, soit du fait des saignées répétées, soit du fait des injections multiples d'antigène.

En outre nous avons étudié chez les chevaux neufs le sens de l'épreuve de Schick afin de voir s'il n'y a pas un rapport entre les groupes sanguins et la réaction de Schick chez le cheval.

Manuel opératoire

Nous avons réparti les chevaux à examiner en plusieurs séries de 11 chevaux chacune. Pour chaque série on prend du sang à ces animaux, on divise le sang recueilli en deux parties, de façon à avoir, pour un même sang, d'une part du sérum et d'autre part des globules citratés. On fait alors réagir chaque sérum sur les globules des divers sangs de la même série. On note où se produit l'agglutination. On peut ainsi « grouper » les sangs et avoir à sa disposition des sérums dont on connaît les propriétés agglutinantes (voir le tableau plus loin).

Toutes les phases de cette opération doivent être effectuées avec une propreté absolue et rigoureuse. Les trocarts, les seringues, les aiguilles et les tubes doivent être préalablement stérilisés de manière à empêcher toute pullulation microbienne dans le sang et le sérum recueillis au cours de ce travail.

En effet, THOMSON a montré que le développement microbien peut changer et détruire les propriétés des hématies et donner lieu à de fausses agglutinations.

Cependant si on a le soin d'examiner le sang immédiatement après le prélèvement, ce que nous conseillons particulièrement, on n'aura pas besoin de cette stérilisation rigoureuse dans le prélèvement du sang. Dans tous les cas, mieux est de prélever le sang stérilement, soit pour être rassuré quant à la signification des résultats, soit pour avoir un sérum stérile dans le cas où l'on désire garder ce sérum pour s'en servir plus tard.

Les chevaux seront saignés à la jugulaire au moyen d'une seringue armée d'une aiguille ou d'un trocart de petit calibre. On change le trocart ou la seringue pour chaque cheval de façon à ne pas mélanger le sang d'un individu avec un autre.

Le sang de chaque animal sera recueilli ensuite dans deux tubes à essai dont un contient une quantité de solution de citrate de soude à 2 % dans l'eau physiologique, quantité suffisante pour empêcher la coagulation du sang (1 cc. de cette solution citraté de 2 % pour 10 cc. du sang : soit 2 p. 1.000).

La partie du sang qui est consacrée à préparer des globules et qu'on a recueilli dans le tube contenant de la solution de citrate de soude, sera centrifugé, les hématies seront ensuite lavées avec l'eau physiologique. Les globules ramenés au volume initial de sang sont dilués alors au vingtième en eau salée stérilisée.

En général laver l'hématie pour la réaction d'iso-agglutination n'est pas nécessaire. Si on désire laver, il faut le faire une seule fois ; car selon SCHUTZ, WOHLISCH, ISSAC, le lavage trop prolongé entraîne de l'agglutinogène, ce qui compromet ensuite la réaction.

Les recherches toutes récentes de DUJARRIC-KOSSOVITCH sur l'origine des agglutinogènes semble confirmer le fait précédent. En effet, d'après ces auteurs, l'agglutinogène ne se trouve que dans le stroma globulaire, l'hémoglobine ne joue

aucun rôle dans la réaction d'iso-agglutination. Il est possible donc que les lavages successifs et prolongés emportent en partie cet agglutinogène qui n'est fixé que sur le stroma globulaire, c'est-à-dire à la surface du globule.

Dans tous les cas, ce qui est pratiquement démontrable et que nous avons constaté en particulier dans nos recherches, au moyen des échantillons lavés et non lavés ou légèrement lavés des mêmes hématies, ce que le lavage prolongé des hématies diminue l'intensité de la réaction d'iso-agglutination.

Cette question de lavage des hématies doit être considérée comme importante toutes les fois que l'on a à rechercher la réaction de l'iso-agglutination dans le sang de cheval qui est très pauvre en agglutinine. Dans ce cas un seul lavage est largement suffisant.

Pour effectuer la réaction d'iso-agglutination chez le cheval nous avons employé tantôt la méthode sur des lames (DE BETH-VINCENT), tantôt celle de DUNGERN-HIRSZFELD et tantôt simultanément l'une et l'autre.

Méthode sur des lames. — Sur une lame porte-objets on met une goutte de sérum à examiner et une goutte des hématies lavées on les mélange soigneusement avec un petit agitateur en ayant la précaution de ne pas étaler la goutte sur la lame et on note le résultat au bout de 3 à 5 minutes et même plus.

Souvent la réaction est terminée en quelques minutes mais le mieux est de ne pas faire les lectures trop vite ; car l'iso-agglutinine présente dans le sérum de cheval étant généralement réduite à une quantité très faible, l'iso-agglutination n'est jamais intense et ne se manifeste pas aussi nettement et aussi rapidement que chez l'homme, cette méthode est la plus simple, la plus pratique et la plus rapide ; elle nous a donné toute satisfaction.

Nous avons employé aussi la méthode des tubes (DUNGERN-HIRSZFELD) qui est basée sur le même principe : on mélange une à deux gouttes d'hématies lavées pour 4 à 5 gouttes de

sérum et l'on mélange bien, après quoi on laisse les tubes au repos. On note le résultat quelques heures plus tard : la réaction est positive lorsqu'on voit se former des grumeaux dans le liquide. Ces grumeaux se sédimentent rapidement et le liquide devient clair. Dans une réaction positive, après la sédimentation des grumeaux on ne peut plus obtenir en agitant une suspension homogène, tandis que ceci a lieu si la réaction est négative.

Nous avons effectué dans la plupart des cas, simultanément l'une et l'autre de ces méthodes : les résultats sont à peu près les mêmes ; nous préférons cependant la première méthode qui est plus simple et plus rapide, donc plus pratique à manipuler.

Dans tous les cas nous faisons remarquer que la température à laquelle on opère, comme l'a fait déjà remarquer HIRSZFELD, n'est pas indifférente, il faut en effet éviter l'auto-agglutination, qui à basse température est fréquente avec le sang du cheval. Pour éviter cette fausse agglutination nous avons étudié le phénomène d'iso-agglutination toujours à une température supérieure à 20°.

La température plus élevée n'est pas recommandable (par exemple à l'étuve de 37°-40°) car l'agglutinine sera libérée et passera dans la solution (LANDSTEINER, JERVELL, BIALOSUKNIA, HIRSZFELD, etc.).

Nous avons évité une grande partie des erreurs possibles et les fausses agglutinations :

1° Par emploi d'hématies fraîches, lavées une seule fois et diluées au 1/20 ;

2° Par emploi d'une proportion convenable d'hématies et de sérum (un mélange à parties égales de dilution globulaire et de sérum dans la méthode sur lames) ;

3° Par l'exécution de la réaction à une température supérieure à 20° (entre 20 et 30°, jamais à l'étuve à 37°).

Au cours de nos recherches et malgré les précautions prises nous avons rencontré souvent une concentration ainsi qu'une

N° DES CHEVAUX	SÉRUM	LES HÉMATIES										RÉACTION	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DE
													SCHICK
271	VII	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+
272	VIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
273	IX	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
274	X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
275	XI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

Tableau I. — I, II, III, etc..., sérums des chevaux agissant sur les hématies des mêmes chevaux 1, 2, 3...

Les mêmes chevaux après la classification par groupes

		LES HÉMATIES										RÉACTION	
N° DES		11	2	4	6	8	9	10	1	1	5	7	DE
CHEVAUX	SÉRUM	SCHICK											
275	α } XI	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
266	β } II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
268	γ } IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
270	δ } VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
272	ε } VIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
273	ζ } IX	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
274	η } X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
265	θ } I	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
267	ι } III	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
269	κ } V	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+
271	λ } VII	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+
		O			AB				A			B	

Tableau II. — Classification par groupes. A, B, etc... globules (agglutinogènes) α, β, etc., sérums (agglutinines).

Nous avons fait figurer sur le tableau (n° 1) le sens de l'épreuve de la réaction de SCHICK, effectuée elle aussi avant le début de l'immunisation (voir le tableau n° 1 et 2).

D'après ce tableau on voit que la répartition des chevaux en quatre groupes classiques d'après la loi de LANDSTEINER est possible, mais il faut remarquer que les exceptions sont nombreuses qui ne rentrent pas dans la classification.

L'examen du sang des mêmes chevaux pratiqué deux mois plus tard et après leur hyperimmunisation complète a fourni les résultats rassemblés dans le tableau III.

Les mêmes chevaux après leur hyperimmunisation

N° DES CHEVAUX	SÉRUM	LES HÉMATIES										
		11	2	1	6	8	9	10	1	3	5	7
275	XI	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
266	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
268	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
270	VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
272	VIII	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
273	IX	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—
274	X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
265	I	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
267	III	—	+	—	—	+	+	+	—	—	—	+
269	V	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—
271	VII	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—

Tableau III

Si nous examinons et comparons ces deux tableaux III et II nous remarquerons que : 1° le sérum VII de groupe AB qui n'agglutinait aucune hématie avant l'immunisation agglutine après cette immunisation les hématies du cheval 10, c'est-à-dire du même groupe ; 2° que le sérum IX de groupe AB agglutine les hématies n° 6, 8 et I qui n'agglutinaient pas avant ; 3° que les hématies I (groupe A) qui se laissaient agglutiner par les sérums XI et VII ne sont plus agglutinées par ce dernier sérum tandis qu'elles s'agglutinent par le sérum I (groupe AB) qui n'avait aucun effet sur eux avant l'immunisation ; 4° que le sérum VII (groupe B) n'agglutine plus les hématies 8 qu'il agglutinait fortement avant l'hyperimmunisation, etc., etc...

Faisons remarquer toutefois que le sérum XI (cheval 275) de groupe (O) qui est d'ailleurs l'unique sérum rentrant dans ce groupe continue à se classer dans le même groupe (O).

Tableau IV. — VII, XI, II, etc., sérum des chevaux
après la classification par groupe A, B, etc...

A, B, etc., etc., globules (agglutinogènes). α , β , etc., etc.,
sérum (agglutinines).

Les exceptions mises à part nous avons chez les animaux hyperimmunisés et producteurs de sérum la même répartition par groupe que nous avons chez les chevaux neufs (nous n'avons pas rencontré dans cette série de sang appartenant au groupe B, groupe d'ailleurs rencontré peu fréquemment).

Voici maintenant les résultats d'un second examen pratiqué deux mois après le premier, les animaux ayant continué à recevoir des injections d'antigène et ayant été saignés plusieurs fois durant cette période (voir le tableau V).

N° DES CHEVAUX	SÉRUM	LES HÉMATIES										
		7	11	2	4	6	5	9	10	1	3	8
254	VII	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104	XI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
247	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
249	IV	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
251	VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250	V	—	—	—	+	+	—	+	—	+	—	—
263	IX	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—
29	X	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
246	I	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
248	III	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
259.	VIII	—	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—

Tableau V. — Les mêmes chevaux que ceux du tableau IV
après deux mois d'intervalle

Nous constatons donc ici, d'après les résultats du tableau V les mêmes changements que nous avons observés chez les chevaux neufs ou en cours d'hyperimmunisation ; ces changements ici encore ne semblent obéir à aucune règle.

Remarquons seulement que le sérum VII du cheval 254 de groupe O continue à se classer dans le même groupe. Nous

avons fait déjà la même remarque pour l'un des chevaux neufs (cheval 275) qui également appartenaient à ce groupe.

Il est curieux de remarquer que ces chevaux, dont les hématies ont la propriété d'échapper à toute agglutination, sont assez nombreux (30 %) ; par contre, ceux d'entre ces animaux dont les sérums agglutinent les hématies des autres groupes sont très rares nous n'avons rencontré au cours de nos recherches que 4 % des chevaux qui présentaient cette propriété particulière.

Frappé de cette fixité des propriétés iso-agglutinantes chez ces animaux (275 et 254), nous avons examiné leur sérum comparativement avec les hématies d'un grand nombre de chevaux normaux et hyperimmunisés. Ces sérums agglutinaient les hématies de presque tous les chevaux des autres groupes et sur 115 chevaux ainsi examinés, nous n'avons trouvé que trois cas qui échappaient à cette règle.

En recherchant la fixité de la réaction d'iso-agglutination pour les autres groupes, nous avons constaté que les variations les plus fréquentes et les plus nombreuses se rencontrent chez les chevaux appartenant aux groupes A et B.

Le groupe AB est plus stable que les précédents mais, comme nous l'avons vu, c'est le groupe O (ni A ni B) qui relativement offre la plus grande stabilité.

En comparant le pouvoir antitoxique des sérums des chevaux hyperimmunisés et leur réaction d'iso-agglutination (voir le tableau IV) on constate qu'il est très difficile de mettre en évidence une relation quelconque entre la valeur antitoxique et le groupe sanguin.

CONCLUSIONS

De tout ceci nous pouvons conclure que :

- 1° Le phénomène d'iso-agglutination existe chez le cheval ;
- 2° La répartition des chevaux en quatre groupes classiques

d'après la loi de LANDSTEINER, est possible mais il faut remarquer que les exceptions sont nombreuses qui ne rentrent pas dans la classification ;

3° Le phénomène d'iso-agglutination n'est pas une propriété fixe du sang de cheval (au moins chez les chevaux immunisés et hyperimmunisés contre la toxine diphtérique et tétanique). Les variations de groupes sont nombreuses au cours de l'hyperimmunisation antitoxique et cela pendant toute la durée de la vie de cet animal consacrée à la production des sérums antitoxiques.

La fixité de ce phénomène d'iso-agglutination doit être recherchée chez les chevaux neufs avant toute immunisation artificielle pour voir si ces changements sont dus à l'intervention ou bien si, comme nous le pensions, ce phénomène est aussi variable chez les chevaux neufs, n'ayant subi aucune intervention quelle qu'elle soit ;

4° Le sens de la réaction de SCINCK ne semble pas avoir chez le cheval tout au moins, de relation directe avec le groupe sanguin ;

5° Il est très difficile de mettre en évidence une relation quelconque entre la valeur antitoxique et le groupe sanguin.

I. — Mode d'injection de l'anatoxine dans la production de l'antitoxine. — Injection de rappel.

Dès la découverte de l'anatoxine diphtérique (1923) et surtout au cours des premiers essais de vaccination antidiphtérique chez l'homme, par l'anatoxine diphtérique, on s'est rendu facilement compte que le mode d'injection dans la production de l'antitoxine a une importance capitale au point de vue pratique. RAMON lui-même est le premier à signaler que « deux doses d'antigène même faibles, injectées à intervalle de temps très long valent mieux au point de vue de l'immunité antitoxique conférée, que plusieurs doses plus fortes injectées à intervalles rapprochés ».

Plus tard il a été établi que, dans l'immunisation à l'aide de l'anatoxine tétanique chez l'homme (RAMON-ZOELLER) et chez les animaux (RAMON et DESCOMBEY), le sujet qui a été vacciné contre le tétanos à l'aide de deux ou trois injections d'anatoxine tétanique, a acquis de ce fait une aptitude particulière à tirer parti de l'antigène spécifique qui lui est injecté de longs mois après la vaccination. C'est cette dernière injection d'anatoxine qui est appelée depuis injection de rappel.

Prenons comme exemple l'immunisation et l'hyperimmunisation antitétanique des chevaux par l'anatoxine tétanique :

RAMON et DESCOMBEY ont montré dès 1925 que le cheval auquel on injecte une première dose d'anatoxine de 10 cc. n'accuse, au bout de quelques semaines, qu'une immunité minime, souvent à peine décelable. Des injections plus copieuses, de 20, 30, 50 et 100 cc. et même plus, donnent le même résultat. Mais si l'on injecte quinze jours après une première injection d'anatoxine tétanique de 10 cc., une deuxième injection de même quantité d'anatoxine, l'immunité inappréciable immédiatement avant la deuxième injection atteint trois semaines plus tard une valeur considérable puisque 1 cc. de sérum neutralisera 1 à 3 doses mortelles pour le cobaye.

Ceci montre que sous l'influence d'une première injection d'anatoxine, l'organisme animal acquiert une aptitude spéciale à répondre ultérieurement à une seconde injection par la production relativement intense de l'antitoxine.

Mais l'expérience montre que si les deux injections sont faites à huit jours d'intervalle seulement l'immunité obtenue ne vaut guère mieux que celle qui résulte d'une seule et unique injection.

Par contre, si l'on allonge l'intervalle entre ces deux injections et si l'on n'effectue la deuxième injection qu'après un mois et même plus, on se rend compte que l'immunité de ces animaux est telle que les sérums neutraliseront en moyenne de cinq à vingt doses mortelles, cela dix jours après la seconde injection.

De tout ceci il résulte que la production d'antitoxine est d'autant plus élevée que l'intervalle de temps entre les deux injections est plus grand.

Cette importance du mode d'injection dans la production et l'apparition de l'antitoxine n'est pas spéciale à l'immunité antitétanique ; il semble au contraire, comme l'a montré RAMON, que c'est plutôt une loi générale de l'immunité antitoxique et aussi dans certains cas de l'immunité antimicrobienne.

En effet, dans son premier mémoire sur l'anatoxine diphtérique, RAMON a montré que si l'on injecte à un cobaye deux doses d'anatoxine diphtérique à huit jours d'intervalle, l'immunité spécifique qui en résulte est bien moins prononcée que si les deux injections sont faites à trois semaines ou un mois d'intervalle.

Cette même loi a pu être vérifiée à propos de l'immunité vis-à-vis de l'injection expérimentale par les germes du groupe typho-paratyphique par GORY et GRASSET.

Dans l'exemple suivant nous allons voir, l'après RAMON et DESCOMBEY, l'influence des intervalles plus prolongés encore, un an par exemple, sur la production d'antitoxine.

30.000 chevaux ont été vaccinés en novembre-décembre 1929 contre le tétanos. La vaccination est effectuée d'après le procédé courant : deux injections d'anatoxine tétanique au tapioca de chacune 10 cc. à un mois d'intervalle.

En octobre 1930, une saignée d'épreuve est faite chez une centaine de ces chevaux pris dans ce lot et un dosage d'antitoxine tétanique permet de déceler une quantité d'antitoxine capable de neutraliser une ou plusieurs doses mortelles de la toxine pour le cobaye (1/1.000 d'unité internationale par cc. de sérum) ; quantité suffisante pour mettre le cheval immunisé à l'abri de la toxi-infection tétanique mortelle pour un cheval vacciné.

En novembre 1930, c'est-à-dire un an après la vaccination tétanique, ces animaux reçoivent une nouvelle injection dite de rappel, de 10 cc. d'anatoxine tétanique (titrant 8 unités anatoxiques) additionnée de tapioca.

Voici, à titre d'exemple, la valeur en unités antitoxiques (internationales) d'un certain nombre de sérums recueilli 15 jours après l'injection de rappel.

N° DES CHEVAUX	TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS EN UNITÉS ANTITOXIQUES
322.....	+ 6
232.....	+ 2
324.....	+ 6
325.....	+ 6
326.....	+ 2

Ces résultats montrent que l'immunité antitoxique est considérablement augmentée chez les chevaux vaccinés contre le tétanos qui reçoivent un an après cette vaccination une seule dose d'anatoxine ; elle passe en effet, en quelques jours, de 1/1.000 d'unité, à 2 à 20 unités et plus, elle se trouve donc multipliée 2.000 fois, 20.000 fois, etc., etc.

Si l'on continue l'injection d'anatoxine-tapioca à doses progressivement croissantes, 50 et 100 cc. à six jours d'intervalle, on verra que le taux de l'antitoxine dans le sérum s'élèvera

encore et il peut arriver trois semaines après l'injection de rappel à une moyenne de 300 unités antitoxiques.

Si l'on se rappelle que le sérum des chevaux neufs qui ont reçu une seule injection de 10 cc. d'anatoxine ne contient, quinze jours après cette injection, que des traces à peine appréciables d'antitoxine, on se rend compte de l'importance du rôle de l'organisme animal dans l'aptitude des animaux antérieurement vaccinés contre le tétanos à la production de l'antitoxine tétanique.

De tout ceci on peut tirer deux résultats importants en guise de conclusion :

D'abord l'accroissement de l'immunité antitétanique sous l'influence de l'injection de rappel est si considérable qu'il est tout indiqué dans la pratique de l'immunisation active du cheval. Et ensuite l'hyperimmunisation facile et rapide des chevaux vaccinés contre le tétanos montre une aptitude particulière de ces animaux, aussi sont-ils tout désignés pour la production intensive de l'antitoxine tétanique et par conséquent pour la préparation rapide et économique d'un sérum antitétanique de valeur très élevée.

II. — Stimulation de l'organisme producteur d'antitoxine par les substances non spécifiques

En règle très générale, lorsque l'on hyperimmunise un cheval par des injections sous-cutanées de doses croissantes d'antigène diphtérique, toxine ou anatoxine, son sérum s'enrichit progressivement en antitoxine. Au bout d'un temps qui varie avec nombre de facteurs : valeur de l'antigène, qualité individuelle des animaux, etc., etc., le pouvoir antitoxique du sérum atteint un certain degré, lequel ne semble guère devoir être dépassé, quoi que l'on fasse. Malgré le soin que l'on prend de soumettre les animaux, entre deux saignées, à des réinjections massives d'antigène, la richesse du sérum en

antitoxine n'augmente plus. Elle reste quelquefois stationnaire durant quelques semaines, mais plus souvent elle baisse pour ne plus remonter par la suite.

Dans le but de faire remonter le pouvoir antitoxique lorsqu'il a commencé à baisser, on a effectué de nombreuses tentatives. On a employé par exemple de la pilocarpine (SALOMONSEN et MADSEN) ; des sels de manganèse (WALBUM), des réinjections d'hématies de cheval hyperimmunisé (PENFOLD), des doses énormes d'antigène (SORDELY, RENAUX), etc., etc.

Dans divers instituts de sérothérapie dès que le maximum en antitoxine est obtenu, on se contente de saigner les chevaux à blanc, ou tout simplement on effectue une dizaine de jours après la dernière injection, une saignée de 6 à 8 litres que l'on renouvelle périodiquement tous les 15 jours ou tous les mois.

Or, dès l'année 1923-1924, en faisant les dosages des sérums antidiphtériques, RAMON a constaté que parmi les sérums soumis au dosage de l'antitoxine, quelques-uns d'entre eux, dont le titre antitoxique avait jusque là baissé progressivement et plus ou moins fortement présentent une augmentation souvent très notable, quelquefois considérable, de leur contenu en antitoxine (parfois si forte qu'elle arrive à faire doubler la quantité d'antitoxine).

Des examens attentifs lui montrent par la suite que c'est à la faveur d'un abcès se développant au point d'injection de l'antigène que se produit l'augmentation d'antitoxine. C'est ainsi qu'en ajoutant à de l'antitoxine diphtérique soit du pus soit des germes de la suppuration recueillis chez les chevaux à abcès, et en injectant à d'autres chevaux en cours d'immunisation cet antigène ainsi contaminé, on peut arriver à provoquer chez ces animaux la formation d'abcès et en même temps un accroissement plus ou moins sensible de l'immunité antitoxique.

L'expérience montre, par contre, que si on provoque l'abcès en dehors du lieu d'injection de l'antigène, cet accroissement

est à peine marqué, sinon nul. De même on s'est rendu compte ultérieurement que la formation d'abcès et la réaction générale trop vive n'est nullement nécessaire. Les conditions les plus favorables consistent dans la production, à l'endroit de l'injection de l'antigène, d'un œdème inflammatoire plus ou moins volumineux. Cette réaction locale entraîne elle-même une réaction générale ménagée (RAMON).

Or, les abcès septiques qu'on peut provoquer facilement avec les germes banals ne sont pas toujours sans inconvénients. La suppuration se tarit quelquefois fort lentement et la réaction générale est parfois très intense ; de plus certains germes peuvent passer dans la circulation et amener des conséquences plus ou moins graves.

Pour réaliser un œdème inflammatoire à l'endroit d'injection de l'antigène et cela sans aucun concours de microbes, il faut donc chercher à provoquer une inflammation et des abcès aseptiques comme ceux que l'on provoque pour les recherches sur la phagocytose par exemple.

C'est ainsi qu'un grand nombre de substances d'origine différente ont été tour à tour essayées par RAMON lui-même : La mie de pain, les grains d'aleurone, etc., etc., sont essayés au commencement, ensuite c'était le tour des antigènes gélatinés et gélés et enfin des substances irritantes comme les amidons ; et c'est parmi ces dernières substances que le choix de RAMON est enfin arrêté sur le tapioca.

Aujourd'hui, l'avantage pratique de l'addition à l'antigène d'une petite quantité de poudre de tapioca finement broyée et stérilisée s'est partout affirmé.

En injectant ce mélange anatoxine-tapioca sous la peau d'un animal, il y a dans les jours qui suivent l'injection un œdème inflammatoire et un véritable afflux leucocytaire qui ont pour résultat un retard considérable dans la résorption de l'antigène et une augmentation sensible de la production d'antitoxine.

C'est ainsi que les chevaux dont l'immunisation est commencée par des injections sous-cutanées de doses progressi-

vement croissantes, 10, 25, 50, 75 et 100 cc. de mélanges l'anatoxine tétanique et de tapioca, à raison d'une dose par semaine, possèdent après la dernière injection une immunité telle que 1 cc. de leur sérum neutralise en moyenne 10.000 à 50.000 doses mortelles de toxine pour le cobaye.

Par comparaison, le sérum des chevaux témoins qui ont reçu aux mêmes dates les mêmes quantités de la même anatoxine mais sans tapioca, neutralise à peine 300 à 1.000 doses mortelles au centicube.

Nous donnons ici d'après DESCOMBEY les résultats d'un exemple frappant sur le pouvoir antitoxique de sérum de certains chevaux hyperimmunisés par la méthode anatoxine-tapioca :

N° DES CHEVAUX	POUVOIR ANTITOXIQUE EN UNITÉS INTERNATIONALES
107.....	2.000
108.....	300
109.....	1.600
110.....	1.400
112.....	1.200
113.....	2.200
114.....	2.400
116.....	400
118.....	600
119.....	1.800
120.....	1.400

C'est en comparant les résultats du tableau ci-dessus avec les résultats obtenus avant l'apparition de l'anatoxine et de la méthode au tapioca, où le pouvoir antitoxique de sérum ne dépassait pas en général 50 unités par cc., qu'on appréciera les avantages que l'on peut retirer de l'utilisation de la technique qui met en œuvre l'anatoxine et la méthode dite de tapioca.

Ainsi, la simple adjonction à l'antigène d'une substance telle que le tapioca, sans valeur spécifique, permet d'augmenter fortement la production de l'antitoxine tétanique.

Les mélanges d'anatoxine et de tapioca chauffés une heure à

55°-60° confèrent une immunité sensiblement équivalente à celle qu'engendrent les mêmes mélanges non chauffés (RAMON et DESCOMBEY).

L'injection intra-cutanée de l'anatoxine diphtérique, dans certaines circonstances donne une immunité quelque peu meilleure ; ceci doit être attribué à l'influence de la réaction locale plus ou moins vive qui s'exerce, toutes proportions gardées dans le même sens que celle due à l'anatoxine au tapioca (RAMON et DESCOMBEY).

L'antigène rencontre sous la peau, dans des conditions rendues encore plus favorables grâce à l'addition de tapioca, des éléments les plus variés, leucocytes et ferments cellulaires ou plasmiques dont l'afflux est augmenté par la présence du tapioca, cellules conjonctives que multiplie l'inflammation provoquée artificiellement, etc., etc., qui, tout en le retenant et en empêchant son élimination trop prompte, lui font subir sur place, avant son absorption, des modifications plus ou moins profondes. L'organisme peut ainsi utiliser au mieux et avec le minimum de pertes cet antigène pour la production de l'antitoxine (RAMON et DESCOMBEY).

A côté du tapioca dont nous venons de montrer le grand rôle dans la production d'antitoxine si bien étudiée par RAMON, il y a d'autres substances utilisées dans le même but et étudiées par divers auteurs, telles que l'alun de potasse, le chlorure de calcium, etc., etc., qui ont les mêmes effets.

L'avantage du tapioca ressort de l'étude de la production comparative de l'antitoxine tétanique faite par RAMON.

N° DES CHEVAUX	1 ^{er} LOT ANA-SEULE UNITÉ ANTITOXINE	N° DES CHEVAUX	2 ^e LOT ANA-ALUN TITRE ANTITOXIQUE
356	0,005	362	0,05
357	0,005	364	1
358	0,01	366	0,05
359	0,005	367	0,05
361	0,005	369	0,1
	0,005		0,24

N° DES CHEVAUX	3 ^e LOT (ANA. + TAPIOCA)	N° DES CHEVAUX	4 ^e LOT (ANA. + CHLORURE DE CALCIUM)
387	0,3	373	0,05
388	0,1	374	0,05
389	0,01	375	0,5
390	2	381	0,5
391	2	386	0,03
	0,88		0,33

Les réactions, en particulier les réactions locales sont très accentuées chez les animaux recevant l'antigène à alun : très gros œdèmes aux endroits de l'injection formant des placards très étendus qui gênent fort la locomotion. Ces réactions sont moins sévères avec le tapioca, moins sévères encore avec le chlorure de calcium (RAMON).

Dans tous les cas il faut remarquer que ces substances : tapioca, chlorure de calcium et alun de potasse n'augmentent pas la valeur intrinsèque de l'antigène, ils amènent seulement l'organisme à tirer un meilleur parti de cet antigène pour la préparation de son immunité.

Le mécanisme intime de l'augmentation de l'immunité sous l'influence de l'addition à l'antigène de substances non spécifiques n'est pas encore élucidé.

Toutefois il y a un fait étudié par divers auteurs et tout dernièrement par SORTUZ qui paraît donner certaines explications et qui d'ailleurs, expérimentalement, est très facile à démontrer, c'est l'hyperleucocytose intense chez les chevaux traités avec anatoxine-tapioca, alun, etc. Cet expérimentateur a pu se rendre compte que ces substances : tapioca, alun, chlorure de calcium produisent toutes chez le cheval de l'hyperleucocytose de plus en plus marquée avec le tapioca, ce qui montre une fois de plus l'avantage de cette substance. La production d'antitoxine est particulièrement intense lorsque l'hyperleucocytose atteint son niveau le plus élevé.

Le chlorure de calcium a un avantage particulier sur le

tapioca et alun de potasse, à ce que cette substance apporte dans l'organisme, en même temps que son effet stimulant, des éléments nutritifs nécessaires à la vie (calcium).

Le tapioca et l'alun de potasse ne sont, à ce point de vue, que les substances inertes. De sorte qu'il y a, aujourd'hui, un avantage pratique, chez les chevaux, une fois l'immunisation terminée à l'aide des injections d'anatoxine-tapioca, à continuer l'hyperimmunisation avec les injections d'anatoxine + chlorure de calcium en raison de un gramme de chlorure pour 100 cc. d'anatoxine.

CONCLUSIONS

I

La présence de l'antigène d'origine toxique dans l'organisme animal n'est pas suffisante à elle seule pour provoquer la production de l'antitoxine.

L'organisme en question prend une part particulièrement active dans cette production. En un mot, il faut que l'animal récepteur soit apte à réagir vis-à-vis de l'antigène introduit. D'où la concurrence obligatoire dans la production de l'antitoxine, de deux facteurs principaux, à savoir :

- 1° L'antigène d'origine toxique ;
- 2° L'animal ;

II

L'espèce à laquelle appartient l'animal en question, la sensibilité naturelle plus ou moins grande de l'organisme à l'égard de la toxine mise en œuvre, l'individualité et nombre de facteurs principaux et secondaires ont une influence plus ou moins marquée dans la production de l'antitoxine et c'est cet ensemble de facteurs qui constituent l'aptitude des animaux à la production de l'antitoxine.

III

Parmi tous les facteurs appartenant en propre à l'animal, ce sont l'espèce et la sensibilité qui jouent le grand rôle dans la production de l'antitoxine.

C'est ainsi que les animaux d'espèces différentes, tels le cobaye, le lapin et la poule, ont une aptitude différente bien

marquée à la production de l'antitoxine tétanique : les cobayes, animaux plus sensibles à la toxine tétanique, ont une aptitude plus grande à la production d'antitoxine tétanique que les lapins qui sont moins sensibles. La poule, animal naturellement réfractaire à la toxine tétanique, mais qui peut devenir sensible expérimentalement, est capable de produire, elle aussi, de l'antitoxine. Mais son aptitude à produire cette antitoxine est très loin d'être la même que celle du lapin et du cobaye.

IV

Il y a une différence individuelle marquée en ce qui concerne la production de l'antitoxine dans une espèce donnée. La quantité d'antitoxine obtenue dans un même groupe d'animaux et avec un même échantillon d'antigène, peut varier dans les proportions de 1 à 2 et même beaucoup plus, d'un animal à l'autre.

V

Cette différence individuelle a été observée chez les autres espèces, en particulier le cheval. C'est à cet animal qu'en règle très générale, on s'adresse pour la préparation des sérums antitoxiques. Depuis le début de la sérothérapie, on s'est donc efforcé de rechercher les facteurs appartenant en propre à cet animal et qui chez lui sont susceptibles d'influencer la production des antitoxines.

VI

Les facteurs de race, d'origine, de sexe, de tempérament (lymphatique, nerveux, sanguin, etc.), du genre de vie (stabilisation, travail), etc., n'ont qu'une influence toute relative sinon nulle, sur l'élaboration des antitoxines par le cheval.

VII

Les chevaux qui présentent, avant toutes les tentatives d'im-

munisation antidiphtérique, une réaction de SCHICK négative (l'immunité d'origine occulte) sont des animaux chez lesquels l'apparition et l'accroissement de l'antitoxine diphtérique est en général plus rapide que chez les chevaux dont cette réaction avait été positive.

Mais la capacité moyenne de production à la fin de l'hyperimmunisation est équivalente chez les uns comme chez les autres de ces animaux et les différences qui peuvent exister initialement sont finalement nivelées par l'utilisation d'un antigène tel que l'anatoxine.

VIII

En ce qui concerne les groupes sanguins, nous pouvons conclure, d'après nos recherches, que le phénomène d'iso-agglutination n'est pas une propriété fixe du sang de cheval (au moins chez les chevaux immunisés et hyperimmunisés contre la toxine diphtérique et tétanique). Les variations de groupes sont nombreuses au cours de l'hyperimmunisation antitoxique et cela pendant toute la durée de la vie de cet animal consacrée à la production de sérum antitoxique.

Ces changements n'obéissent à aucune loi définie et ne nous paraissent pas avoir de signification bien précise.

En aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence une relation quelconque entre la valeur antitoxique et le groupe sanguin.

De même le sens de la réaction de SCHICK ne semble pas avoir, chez le cheval tout au moins, de relation avec le groupe sanguin.

IX

Le mode d'injection de l'antigène dans la production de l'antitoxine a une importance capitale au point de vue pratique. C'est ainsi que deux doses d'antigène même faibles, injectées à intervalle de temps très long valent mieux au point

de vue de l'immunité antitoxique conférée, que plusieurs doses plus fortes injectées à intervalles rapprochés.

Sous l'influence d'une première injection de l'antigène, l'organisme animal acquiert une aptitude spéciale à répondre ultérieurement à une seconde injection par la production relativement intense de l'antitoxine.

Autant l'intervalle entre ces deux injections est grande autant la production de l'antitoxine, après la deuxième injection, est plus intense.

Les chevaux qui reçoivent, un an après leur vaccination contre le tétanos, une injection de 10 cc. seulement de l'anatoxine tétanique donne un sérum dans lequel la quantité d'antitoxine se trouve multipliée 2.000 fois, 20.000, etc.

X

La simple adjonction d'un certain nombre de substances, telles que tapioca, chlorure de calcium, alun de potasse, sans valeur spécifique, permet d'augmenter fortement la production de l'antitoxine.

Ces substances n'augmentent pas la valeur intrinsèque de l'antigène, il amène seulement, l'organisme à tirer un meilleur parti de cet antigène pour la préparation de son immunité.

Vu, le Doyen :

Vu, le Président :

BALTHAZARD.

LEMIERRE.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

CHARLETY.

APPENDICE

Le titrage des sérums antitoxiques

PASSAGES HISTORIQUES

Dès le début de la découverte des antitoxines et de la sérum-thérapie (1890) la nécessité d'apprécier l'activité immunisante des sérums antitoxiques s'est fait sentir.

BEHRING est le premier expérimentateur qui a proposé un système de mesure de cette activité. Il consistait à estimer la valeur d'un sérum d'après la quantité nécessaire pour immuniser un gramme d'animal contre un volume de toxine donné, sûrement mortel, et injecté douze heures après le sérum. Ainsi un gramme de sérum actif au millième immunise 1 kg. de cobaye contre une dose fixée de toxine, capable de tuer dans un délai connu.

Cette méthode avait été adoptée dans les études sur le tétanos et dans les premières expériences sur la diphtérie.

Le même auteur avait proposé, un peu plus tard, une autre unité de mesure pour le sérum antidiphtérique, à savoir : la quantité de sérum nécessaire pour immuniser 5.000 grammes de cobaye contre une dose dix fois mortelle d'une culture diphtérique âgée de 2 jours, le sérum était injecté un quart d'heure avant le virus, dans ce cas, on apprécie la propriété thérapeutique du sérum plutôt contre l'infection que contre l'intoxication.

Plus tard EHRLICH d'accord avec BEHRING a proposé une autre unité immunisante. Cette nouvelle unité immunisante était présentée par 0 cc. 1 d'un sérum qui, mélangé à 0 cc. 8 de toxine normale, la neutralise au point que le tout, injecté sous la peau d'un cobaye, ne produit aucun œdème.

Dans ce cas il faudrait opérer simultanément avec le sérum à éprouver et avec le sérum et la toxine-étalon d'EHRLICH.

Pour l'école française toutes ces définitions étaient compliquées et difficiles à réaliser. « L'essentiel, comme disait M. Roux à cette même époque, est de se comprendre ; à notre avis, cela était plus facile quand on disait d'un sérum que son pouvoir immunisant est de 1.000 ou de 10.000 vis-à-vis d'une toxine ou d'un virus tuant les témoins en tant d'heures. »

On disait par exemple que le pouvoir préventif d'un sérum est supérieur à 50.000 quand un cobaye résistait à l'inoculation de 1/2 cc. de la toxine fraîchement filtrée et très active, si on lui injectait douze heures avant, une quantité de sérum égale à la cinquante millième partie de son poids.

Plus tard, les recherches d'EHRLICH sur la toxine et l'antitoxine diphtériques, aboutirent à une méthode de titrage de sérum antidiphtérique qui était plus exacte et plus pratique que celle dont on s'était servi auparavant. Cette méthode existe encore aujourd'hui et on s'en sert dans presque tous les laboratoires sérologiques. Nous donnerons plus loin la technique de cette méthode.

Mais cette méthode expose à des erreurs tenant à des causes diverses dont la principale est la résistance individuelle variable des animaux d'épreuve. Nous avons déjà étudié avec nombre de détails cette résistance individuelle des animaux, en particulier chez les cobayes ainsi que la différence d'aptitude de ces animaux à la production de l'antitoxine. Nous avons montré, en outre, que cette différence individuelle dépend surtout des facteurs appartenant en propre à l'animal (page 91).

On cherchait depuis longtemps à diminuer cette cause d'erreurs en opérant, autant que possible, sur un grand nombre de cobayes de même âge, de même poids et de même origine. Il en résulte alors une grande dépense d'animaux assez difficile à se procurer, surtout quand il s'agit de titrer un grand nombre de sérum antitoxique. Un autre inconvénient de cette

méthode de dosage *in vivo* de sérum est que le résultat n'est acquis en général qu'après plusieurs jours.

Aussi a-t-on depuis longtemps cherché à substituer à la méthode de titrage de sérum antitoxique sur le cobaye, un procédé de mesure *in vitro*.

Ainsi DANYSZ (1902), en étudiant sur la ricine et l'antiricine, avait remarqué que ces deux substances se précipitent mutuellement et que la précipitation se manifeste en premier lieu dans le mélange où l'antigène et l'anticorps se trouvent, en proportion équivalente.

CALMETTE et MASSOL (1909) faisaient connaître des propriétés semblables en ce qui concerne le venin de cobra et le sérum anticobraïque. Ces savants estiment qu'il serait possible de procéder à un dosage approximatif du sérum antivenimeux par la mise en œuvre du phénomène de précipitation.

NICOLLE, CESARI et DEBAINS en 1919, et indépendamment de ces recherches, W. GEORGI en 1920 arrivent à un procédé de titrage *in vitro* de sérum antitoxique, d'après un principe semblable à celui utilisé par CALMETTE et MOSSOL.

Mais aucune de ces méthodes ne devait voir le jour dans la pratique courante. Ils étaient assez compliqués et très peu sensibles.

G. RAMON en 1922 constata que dans des mélanges de toxine diphtérique employés sous la forme habituelle et de sérum antidiphtérique frais, il se forme, dans certaines conditions, une floculation spécifique ayant une signification toute particulière. Et c'est cette réaction *in vitro* qui depuis, par sa simplicité et son exactitude, constitue la méthode par excellence. Elle est employée aujourd'hui universellement dans la pratique courante de titrage des sérums antitoxiques. C'est la méthode de floculation de RAMON.

Dans le travail que nous venons de terminer, nous avons eu l'occasion de parler à plusieurs reprises de dosage du sérum antitoxique, soit par la méthode *in vivo* d'EHRLICH soit par la

nouvelle méthode de floculation, sans toujours donner une explication suffisante.

Nous allons exposer ici en résumé, la technique de ces deux méthodes différentes de titrage des sérums antitoxiques : d'une part la méthode *in vivo* d'EHRICH et d'autre part la méthode de floculation de RAMON.

Technique de dosage d'un sérum antitoxique d'après la méthode d'Ehrlich

EHRICH proposa tout d'abord l'utilisation de quelques abréviations commodes pour caractériser la toxine et l'antitoxine, à savoir :

1° UA (unité antitoxique). Cette unité représente l'unité de base pour toutes les mensurations quantitatives, relatives à la toxine et à l'antitoxine diphtérique.

Cette unité, qui est connue en Allemagne par le symbole AE (Antitoxine Einheit), représentait au début la quantité d'antitoxine neutralisant exactement 100 doses mortelles de la toxine qu'employait EHRICH lors de ses premiers essais. Une unité antitoxique pouvant saturer 100 doses mortelles d'une toxine, 80 d'une autre. Il n'est donc pas exact de dire qu'une unité antitoxique corresponde à 100 doses mortelles de toxine (S. SCHMIDT).

2° d. m. m. (dose minima mortelle, désignée encore par le symbole D. M. M. ou L. m. n.) est la quantité de toxine (en centimètres cubes) qui, introduite sous la peau d'un cobaye de 250 g., tue l'animal en 4 à 5 jours.

On désigne par Lr la plus petite dose de toxine capable de provoquer des accidents sans pour cela entraîner la mort.

3° Lo (limite zéro, limite de l'action nulle) est la quantité maximum de toxine qui, après additions préalables d'une UA, peut être injectée sous la peau d'un cobaye de 250 g., sans provoquer aucun symptôme, ni local, ni général, d'intoxication diphtérique ;

4° $L+$ (limite de la mort, limite de l'action d'une d. m. m.) est la quantité de toxine qui, mélangée au préalable avec UA, suffit exactement pour tuer un cobaye de 250 g. en 4 à 5 jours.

A première vue on croit s'attendre à ce que la différence entre les valeurs $L+$ et Lo soient égales à une d. m. m. En réalité, elle est toujours plus grande. En effet, si à un mélange constitué par une UA et une dose Lo de toxine, on ajoute une d. m. m. ce nouveau mélange n'est point capable de tuer un cobaye, mais seulement de faire apparaître une légère réaction locale au point de l'injection. Pour tuer le cobaye à coup sûr, il faut ajouter au mélange ($1\text{ UA} + Lo$) de 0,5 à 28 doses minima mortelles suivant les toxines.

Pour expliquer ce phénomène, qui est connu depuis sous le nom du phénomène d'EHRlich, EHRlich a pensé qu'à côté de la toxine vraie, nocive, telle qu'elle est issue immédiatement après la végétation de la bactérie toxigène, il y avait dans ce même milieu des produits de nocivité atténuée (toxone), susceptibles de se combiner avec l'antitoxine, mais avec moins d'intensité, et des produits dépourvus de toute nocivité, capables eux aussi de se combiner avec l'antitoxine (toxoides).

Or, dans une toxine, il y a non seulement, d'après EHRlich, la toxine proprement dite, mais, en proportions indéterminées, des toxones et des toxoides capables de combiner avec l'antitoxine mais avec des affinités variables ; de sorte que, dans un mélange rigoureusement neutre de toxine et antitoxine (ce qui est le cas de Lo) la quantité de l'antitoxine calculée pour neutraliser la toxine, a été ajoutée en excès, car une partie de cette antitoxine a été combinée aux toxones et toxoides.

Si l'on ajoute maintenant à ce mélange neutre de la toxine active, l'antitoxine combinée aux toxones ou aux toxoides se déplacera de ses combinaisons et ira neutraliser la toxine immédiatement nocive qui vient d'être ajoutée. Ainsi s'expliquera ce fait que la toxine fixe plus d'antitoxine qu'elle n'en a besoin pour être neutralisée.

ARRHENIUS et MADSEN, qui ne croient pas à l'existence des

toxones, schématisent autrement le phénomène d'EHRLICH :

Ils calculent les doses d'antitoxine nécessaires pour réaliser avec les toxines des produits de plus en plus négatifs. Ils voient que s'il faut peu d'antitoxine pour enlever à une toxine ses propriétés meurtrières, il en faut beaucoup pour la priver de toute nocivité.

Par exemple, pour obtenir un mélange L+ il faut peu de sérum antitoxique, tandis qu'il en faut beaucoup pour obtenir un mélange Lo. La courbe de neutralisation peut se proposer exactement à la figure qui représente la courbe de la neutralisation d'un acide et d'une base faibles. Ainsi, il n'est plus besoin d'envisager l'existence de toxones ou de toxoïdes, pour expliquer le phénomène d'EHRLICH. (1)

Le titrage d'un sérum antitoxique d'après la méthode d'EHRLICH s'effectue en deux temps :

I. — Dans un premier temps, on titre une toxine par rapport à l'unité antitoxique étalon (sérum étalon) ;

II. — Dans un second, on titre le sérum à étudier par rapport à la toxine qui vient d'être ainsi mesurée.

Manuel opératoire

(pour titrage d'un sérum antidiphtérique)

Pour effectuer le titrage, il faut avoir à sa disposition les matériaux suivants :

1° un sérum étalon ;

(1) Depuis les travaux de BORDET sur l'hémolysine et de DANYSZ sur les antitoxines, le phénomène d'Ehrlich a trouvé une autre conception d'après laquelle la neutralisation de la toxine par l'antitoxine s'effectue non pas suivant une loi de proportions fixes ce qui est dans le cas de théorie d'EHRLICH et conception de MADSEN, mais bien suivant une loi de proportions variables. C'est le phénomène de BORDET-DANYSZ. Et tout se passe selon les vues de BORDET comme si la toxine et l'antitoxine s'unissent suivant des proportions variables d'après la concentration des solutions.

2° une toxine d'épreuve dont on a préalablement désigner la dose minima mortelle ;

3° le sérum dont il s'agit d'effectuer le titrage. Ce sérum doit avoir été préalablement chauffé au bain-marie une heure à 58 degrés ;

4° de l'eau salée (à 8 gr. 50 de chlorure de sodium par litre) stérilisée ;

5° des petits verres coniques recouverts de capuchons en papier filtre et stérilisés à sec, — des pipettes de 1 à 2 cc. graduées par 1/10 de centimètre cube et des pipettes de 1 cc. graduées en centième de centimètre cube.

6° des seringues stérilisées de 1 et de 5 centimètres cubes ;

7° enfin, des jeunes cobayes du poids de 250 gr.

Sérum étalon. — Ce sérum, qui est fourni par l'Institut Pasteur de Paris ou l'Institut Expérimental de Francfort, se présente en solution glycinée et titrée. Le titre est indiqué sur l'étiquette. Il contient généralement dix unités antitoxiques par centimètre cube.

Pour avoir une unité antitoxique (UA) de ce sérum, on prépare avec de l'eau salée stérilisée de dilution convenable de telle sorte que chaque centimètre cube ne renferme qu'une UA. Par exemple, pour un sérum étalon titrant 10 UA par centimètre cube, on prend 1 cc. de sérum et 9 cc. d'eau physiologique.

Toxine d'épreuve (Standardtoxine). — La détermination de la dose minima mortelle se fait par injection sous-cutanée, au cobaye de 250 gr., de doses variables de la toxine, en dilution dans l'eau physiologique stérilisée. La d. m. m. est, nous le savons déjà, représentée par la quantité de la toxine qui tue le cobaye en quatre ou cinq jours. L'expérience doit être répétée plusieurs fois.

Cette toxine doit être vieille d'au moins deux mois et avoir été conservée à la glacière sous une couche de toluol, dans un flacon bien bouché. Elle est alors suffisamment stable et

le même échantillon peut servir à un grand nombre de titrage.

L'Institut Pasteur de Paris et l'Institut de Francfort préparent la toxine d'épreuve toute titrée qu'on peut se procurer dans le cas où l'on n'a pas à sa disposition une bonne toxine titrée.

Premier temps. — *Titration de la toxine.* — *Détermination de la valeur L_0 et L_+ .*

Dans une série de verres coniques stérilisés, on fait des mélanges de toxine à doses croissantes à partir de 100 fois la dose minima mortelle (soit pour un toxine dont la d. m. m. est $0,004 \times 100 = 0,4$) avec un centicube de dilution de sérum étalon contenant 1 UA : on complète dans tous les verres au même volume soit 4 cc., avec de l'eau salée et on injecte au bout de quelques minutes, successivement, chaque mélange à un cobaye du poids de 250 à 300 gr., sous la peau de l'abdomen. On se sert de la même seringue en commençant par le mélange le plus faible en toxine :

a) La quantité de toxine contenue dans le mélange dont l'injection ne donne ni la mort, ni les accidents locaux chez le cobaye au quatrième jour, est la dose de L_0 .

b) La quantité de toxine contenue dans le mélange dont l'injection provoque la mort du cobaye en quatre ou cinq jours est la dose de L_+ .

C'est surtout cette dernière dose de L_+ qui va désormais servir pour effectuer le titrage du sérum antidiphthérique dont il s'agit d'établir la valeur antitoxique.

On comprend l'intérêt de l'emploi de cette dose L_+ ; la recherche d'une neutralisation complète entraînerait à des erreurs, lorsque les cobayes survivent au delà de quatre à cinq jours, les animaux présentent des accidents, suivant leur résistance héréditaire, leur nourriture, leur race, meurent ou

survivent à l'inoculation. En choisissant une dose qui entraîne la mort en quatre ou cinq jours, on observe bien une neutralisation, mais elle laisse encore une marge suffisante de toxicités pour que ces effets puissent en être exactement appréciés

Deuxième temps. — *Titrage d'un sérum en unité antitoxique.*

Dans une série de petits verres coniques stérilisés, on mélange une dose limite mortelle (L+) de toxine, établie par l'épreuve précédente, à des dilutions variables du sérum à étudier. Chacun de ces mélanges sera injecté à un cobaye de 250 à 300 gr., toujours sous la peau. On cherche alors le mélange qui tue le cobaye en quatre ou cinq jours : ce mélange contient une UA par centicube.

Un sérum titre au moins 500 unités par exemple, lorsque, dilué à 1/499 dans l'eau physiologique, 1 centicube de cette dilution mélangée à la dose L+ de la toxine ne tue pas en moins de quatre jours le cobaye de 250 gr. et ainsi de suite.

La technique que nous venons de décrire est effectuée pour le titrage d'un sérum antidiphtérique dans tous les laboratoires de sérothérapie..

La Conférence internationale de sérologie tenue à Londres en 1921 a proposé d'établir une commune mesure de titrage du sérum antitétanique au moyen d'un sérum étalon en utilisant les procédés employés pour le dosage antidiphtérique.

**Technique d'un dosage de sérum antitoxique
par la méthode de floculation de Ramon**

La floculation, nous l'avons vu (page 29), désigne à l'observateur le mélange dans lequel la toxine a saturé ou a été saturée par l'antitoxine. Il résulte de là que, connaissant le pou-

voir flocculant ou saturant d'une toxine donnée vis-à-vis de l'antitoxine, c'est-à-dire ayant déterminé la quantité d'antitoxine que cette toxine peut saturer, on peut mesurer sans difficultés le pouvoir antitoxique d'un sérum quelconque.

Le pouvoir saturant ou flocculant d'une toxine que l'on destine au dosage du pouvoir antitoxique du sérum doit être déterminé au préalable par l'emploi d'un sérum étalonné d'après une unité de mesure : par exemple l'unité d'EHRLICH, qui est fréquemment en usage.

Le dosage d'un sérum par la méthode de flocculation consiste donc à deux opérations successives, à savoir :

1° Détermination du pouvoir saturant ou flocculant de la toxine destinée au dosage.

2° Le dosage proprement dit d'un sérum antitoxique quelconque.

*Détermination du pouvoir saturant de la toxine destinée
au dosage et établissement de la table de titrage
correspondant à cette toxine*

Dans des tubes à essai contenant, par exemple, 20 centimètres cubes de la toxine choisie en vue des dosages futurs, on ajoute des volumes décroissants : 2 centimètres cubes, 1 cc. 8, 1 cc. 6, 1 cc., 0,9, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1 du sérum étalon (dilution dans l'eau distillée d'un sérum étalon sec, conservé à l'abri de l'air et de la lumière). On agite, puis on laisse reposer à la température du laboratoire et on observe la flocculation initiale. Supposons qu'avec le sérum étalon titrant 250 unités d'EHRLICH au centimètre cube, cette flocculation apparaisse dans le tube contenant 20 centimètres cubes de toxine + 0cc. 8 de sérum ; la flocculation étant l'indice de la saturation, il faut donc, pour saturer 20 centimètres cubes de toxine, $250 \text{ unités} \times 0,8 = 200 \text{ unités}$ d'antitoxine. Par conséquent, un sérum qui flocculerait en présence de cette même

quantité de toxine, à la dose de 1 centimètre cube, titrerait 200 unités au centimètre cube ; un autre sérum qui ferait apparaître la floculation initiale avec 0 cc. 4 seulement serait plus riche en antitoxine, puisque d'après la floculation des 0 cc. 4 contiendraient 200 unités ; il tirerait $200/0,4=500$ unités au centimètre cube.

En faisant les calculs des valeurs correspondant à chaque dose de sérum, on obtient une table de titrage telle que celle-ci qui n'est évidemment valable que pour une toxine donnée.

DOSES DE SÉRUMS AJOUTÉES
A 20 CC. DE TOXINE

TITRE CORRESPONDANT A CHAQUE
DOSE LORSQU'ELLE PROVOQUE
LA FLOCCULATION INITIALE

2 cc.	100 unités
1.8	110 —
1.6	125 —
1.4	145 —
1.2	165 —
1	200 —
0.9	220 —
0.8	250 —
0.7	290 —
0.6	330 —
0.5	400 —
0.45	440 —
0.2	1.000 —
etc.	

Dosage d'un sérum antidiphthérique quelconque. — On prépare, comme précédemment, une série de tubes contenant 20 centimètres cubes de toxine et 2 centicubes, 1 cc. 8, 1 cc. 6, 0 cc. 9, 0 cc. 8, 0 cc. 7, 0 cc. 6, etc., du sérum à essayer. On agite puis on laisse au repos à la température de la chambre et on note l'apparition de la première floculation. Si elle se produit dans le mélange 20 centimètre cubes de toxine plus 0 cc. 6 de sérum on voit que le titre correspondant du sérum dans la table précédente est de 330 unités. On peut recom-

mencer le dosage avec des quantités de sérum légèrement supérieures ou légèrement inférieures à 0 cc. 6 ; on se rapprochera ainsi d'une mesure précise.

Influence de la chaleur sur le phénomène de la floculation

La floculation est assez lente à la température ordinaire ; elle est plus rapide à l'étuve de 37° et plus rapide encore au bain-marie à 45°. Mais, dans la pratique courante, il est préférable d'opérer à la température de laboratoire 18-20°, car alors la différence entre le moment de l'apparition de la floculation initiale et celui des autres floculations qui se montrent par la suite est plus grand et la réaction gagne ainsi la précision.

A 56-60°, la floculation subit des modifications importantes. A partir de cette température et jusqu'à 65°, la floculation apparaît avec un retard de plus en plus prononcé et dans un mélange contenant une quantité de sérum inférieur à celle qui normalement doit entraîner la floculation type (RAMON). Mais une fois cette température (65°) dépassée, la floculation perd toute sa signification.

Influence de la toxine dans la réaction de floculation

Pour le dosage de l'antitoxine, il n'est pas besoin de recourir à l'emploi d'une toxine particulière. Une toxine « forte » n'est pas indispensable, il y a seulement avantage à se servir d'une bonne toxine, on gagne ainsi du temps ; la floculation est plus rapide et on évite ainsi les dilutions des sérums attitrés. C'est précisément aussi pour éviter ces dilutions, qui introduisent des risques d'erreur et compliquent la technique, qu'il est préférable de prendre comme quantité fixe de toxine une assez grande quantité, par exemple 20 cc., qui a, en outre, l'avantage de rendre la réaction beaucoup plus nette (RAMON).

Le milieu de culture, l'alcalinité plus ou moins prononcée de la toxine ne semblent pas avoir d'influence sensible au point de vue du dosage de l'antitoxine (RAMON).

Pour éviter la contamination accidentelle et les cultures possibles au cours du titrage, on peut additionner la toxine, au moment de l'emploi, d'une minime quantité d'antiseptique, par exemple 1/2.000 de formol ; la floculation n'en est aucunement troublée (RAMON).

La floculation est une réaction parfaitement visible à l'œil nu, c'est-à-dire elle est macroscopique ; il n'est pas nécessaire de recourir ni au microscope ni à des appareils spéciaux.

Pour caractériser et évaluer les propriétés neutralisantes et antigéniques d'une toxine, RAMON a introduit une nouvelle unité, l'*unité antigénique* ; c'est la quantité de toxine (indiquée en centimètre cube) qui, en présence d'une unité antitoxique, provenant d'un sérum convenablement choisi, floccule dans un temps plus court que toutes les autres quantités, soit supérieures soit inférieures de la même toxine et cela sous les mêmes conditions d'expérience. Si, par exemple, 0 cc. 1 d'une toxine floccule plus rapidement en présence d'une UA que 0 cc. 11 ou 0,09 de la même toxine, on dira que 1 cc. de cette toxine renferme exactement dix unités antitoxiques.

GLENNY, OKELL et WALLACE désignent par l'indice Lf la quantité de toxine correspondant à une unité antigénique. Une toxine contenant dix unités antigéniques a donc un Lf valeur égale à 0,1. C'est le pouvoir flocculant de la toxine.

Influence du sérum sur la réaction de floculation

Le temps d'apparition de la floculation, constant pour un même sérum frais, est très variable, toutes choses égales d'ailleurs, suivant les sérums, même quand ils contiennent le même nombre d'unité d'EHRLICH. Le temps d'apparition varie de 15 minutes à 12 heures ; très exceptionnellement 24 et même 36 heures à la température du laboratoire (RAMON).

Le temps de floculation est indiqué par le symbole Kf.

La vitesse de floculation dépend, dans certaines mesures, d'une part, de toxine mise en œuvre, d'autre part, du sérum

utilisé; mais il n'y a aucune relation entre le titre d'un sérum exprimé en unité antitoxique et la rapidité avec laquelle le sérum fait flocculer la toxine. De même qu'il n'y a aucun rapport entre la vitesse de la flocculation d'une toxine et sa toxicité (RAMON).

Les sérums ayant subi l'action d'agents physiques ou chimiques entraînent des modifications dans le phénomène de flocculation. C'est ainsi que le séjour long du sérum à la glacière amène un certain retard dans la vitesse d'apparition de la flocculation. De même, pour le sérum gardé longtemps à la température de laboratoire, les changements apportés à la flocculation sont plus accentués (RAMON).

Avec un sérum chauffé une heure à 55-56°, le retard dans l'apparition de la flocculation est notable. A partir de 60-65°, le sérum semble être privé de sa propriété de flocculer en présence de toxine diphtérique (RAMON).

Les sérums purifiés flocculent difficilement ou pas du tout avec la toxine (RAMON et GRASSET).

Les substances chimiques et en particulier les antiseptiques que l'on ajoute quelquefois au sérum influence peu, à des doses minimales, la flocculation (RAMON).

L'action prolongée de certains sels oxydants (chromates) ou réducteurs (nitrites) diminue ou fait disparaître les propriétés flocculantes du sérum antitoxique (S. SCHMIDT).

BIBLIOGRAPHIE

- BEHRING. — (*Deut. med. Woch.*, 1893.)
- BERTHELOT et RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 340.)
- BERTHELOT, RAMON et AMOUREUX. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 83.)
- BIALOSUKNIA et HIRSZFELD. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 1361.)
- BIALOSUKNIA et KACZKOWSKI. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, p. 1196.)
- BRIEGER et FRAENKEL. — (*Bull. Klin. Woch.*, 1890, N^{os} 11 et 12.)
- BRIEGER et BOER. — (*Deut. med. Woch.*, 1896; N^o 49.)
- BRIEGER et WASSERMANN. — (*Centralbl. für Bakt.* XII, 1892.)
- CALMETTE. — (*Bull. médical*, 1895, p. 1061.)
- CALMETTE. — (*Arch. méd.*, 1895, p. 425.)
- CALMETTE, NÈGRE et BOQUET. — Manuel technique de microbiologie et sérologie. (Masson et C^{ie}, éditeur, Paris, 1926.)
- GRUCHET. — La transfusion du sang de l'animal à l'homme, (Masson et C^{ie}, Paris, 1928.)
- DESCOMBEY. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1925, p. 485.)
- (*Ann. Inst. Pasteur*, septembre 1930.)
- (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, p. 239.)
- (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 253 et 315.)
- DUJARIC DE LA RIVIÈRE et KOSSOVITCH. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 373.)
- DUJARIC DE LA RIVIÈRE et KOSSOVITCH. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 137.)
- DUNGERN et HIRSZFELD. — (*Münch. med. Woch.*, 1910, p. 741.)
- EHRLICH. — (*Deut. med. Woch.*, N^o 38, 1898.)
- GAMALEIA. — (*C. R. Soc. Biol.*, février 1892.)
- GLENNY. — (*J. Path. a. Biol.*, 1909.)
- GOLDENBERG et PANISSET. — (*La Revue de Pathologie comparée*, 20 mai 1926.)
- HAMEDY (A.). — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 1095.)
- HAMEDY (A.). — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 1097.)
- HAMEDY (A.). — Voir RAMON.
- HEKTOEN. — (*Journ. of. infect. dis.*, 4, 297, 1907.)
- HIRSZFELD et PRZEMYCKI. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 1360.)
- JANSKY. — (*Kliniky Sbornik*, 2, 1906.)
- KNUD et FABER. — (*Berliner Klin. Woch.*, 1890, p. 717.)
- KITASATO. — (*Zeit. für Hygiene*, VII, 1889, p. 225.)
- KOSSOL. — (*Centralbl. für Bact.*, 1890.)
- KLEIN. — (*Wien. Klin. Woch.*, 1902, p. 16.)
- LAMY. — (*Le Sang*, 3, 1927.)
- LANDOIS. — (*Die Transfusion des Blutes*, Leipzig, 1875.)

- LANDSTEINER. — (*Zentralbl. f. Bacteriol.; Parasitenk. u. Infekt.; Abl.*, 1900, p. 36.)
- LANDSTEINER. — (*Münch. med. Woch.*, 1905/1902.)
- LATTES. — L'individualité du sang. (*Masson et C^{ie}*, Paris, 1929.)
- LE BOURDELLES et SEDELLIAN. — Précis d'immunologie. (*G. Doin et C^{ie}*, 1930.)
- MADSEN et SCHMIDT. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1929, p. 1091.)
- (*Ann. Inst. Pasteur*, 1929, p. 882.)
- MACE (E.). — *Traité pratique de bactériologie.*
- METCHNIKOFF (E.). — *Recherche sur l'influence de l'organisme sur les toxines.*
- 1^o Mémoire. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1897, p. 801.)
- 2^o Mémoire. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1898, p. 81.)
- 3^o Mémoire. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1898, p. 263.)
- 4^o Mémoire. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1900, p. 1.)
- METCHNIKOFF, ROUX et SALIMBENI. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1896, p. 257.)
- METALNIKOV et CHORINE. — (*Ann. Ins. Pasteur*, mars 1930.)
- METALNIKOV et CHORINE. — (*Ann. Inst. Pasteur*, janvier 1929.)
- MOSS. — (*Bull. of John Hopkins hosp.*, 21, 63, 1910.)
- MOSS. — (*Journ. of the Am. med. assoc.*, 68, 1905, 1917.)
- NATTAN-LARRIER, RAMON et GRASSET. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 848.)
- NATTAN-LARRIER, RAMON et GRASSET. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 862.)
- NOCARD et LECLAINCHE. — *Maladies microbiennes des animaux.*
- NICOLLE. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1896.)
- NICOLLE, CESARI et HONAN. — *Toxines et antitoxines.* (*Masson*, 1919.)
- OTTENBERG et FRIEDMAN. — (*Jour. of exp. med.*, 37, 531, 1911.)
- PANISSET et VERGE. — (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 1922.)
- PANISSET. — Voir GOLDENBERG.
- PAUCHET et BECART. — *Transfusion du sang.* (*Doin et C^{ie}*, 1930.)
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 661.)
- — — 1922, pp. 711 et 813.)
- — — 1923, p. 167.)
- — — 1923, p. 2.)
- — — 1924, p. 1432.)
- — — 1927, p. 635.)
- — — 1927, p. 538.)
- — — 1928, p. 1473.)
- — — 1928, p. 1295.)
- — — 1928, p. 1476.)
- — — 1929, p. 485.)
- — — 1929, p. 23.)
- — — 1929, p. 783.)
- — — 1929, p. 487.)
- — — 1929, p. 381.)
- — — 1929, p. 379.)
- — — 1929, p. 287.)
- — — 1930, p. 842.)

- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, p. 938.)
 — — — — — 1930, p. 31.)
 — — — — — 1930, p. 141.)
 — — — — — 1930, p. 942.)
 — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1923, p. 1001.)
 — — — — — 1924, p. 1.)
 — — — — — 1925, p. 1.)
 — — — — — 1926, p. 1.)
 — — — — — 1928, p. 959.)
 — — — — — 1930, p. 291.)
 — (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 1923, p. 261.)
 — — — — — 1923, p. 1331.)
 — — — — — 1924, p. 1436.)
 — — — — — 1924, p. 442.)
 — — — — — 1924, p. 485.)
 — — — — — 1925, p. 137.)
 — — — — — 1929, p. 1452.)
- RAMON (BERTHELOT ET). — (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 1925, p. 340.)
- RAMON, MARTIN et LAFFAILLE. — (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 1928, p. 1452.)
- RAMON, MARTIN et LAFFAILLE. — (*Bulletin de l'Académie de Médecine*, N° 6, 1925.)
- RAMON (BERTHELOT et). — (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 896.)
- RAMON et DESCOMBEY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 434.)
- RAMON et GRASSET. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 436.)
- RAMON et GRASSET. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 1405.)
- RAMON et LEMETAYER. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, pp. 21, 23 et 71.)
- RAMON, LEMETAYER et HAMEDY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 1228.)
- RAMON et LAFFAILLE. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 282.)
- RAMON et ZOELLER. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 1409.)
- RAMON, NOUREDDINE et ERBER. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 562.)
- RAMON et DESCOMBEY. — (*Ann. Ins. Pasteur*, 1927, p. 834.)
- RAMON, DUMAS et BILLAL. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1926, p. .)
- RAMON et GRASSET. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 868.)
- RAMON et ZOELLER. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 803.)
- RAMON. — (*Presse médicale*, N° 21, 1926.)
- ROUX. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1894, p. 722.)
- ROUX et MARTIN. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1894, p. 609.)
- ROUX et VAILLARD. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1893, p. 65.)
- ROUX et YERSIN. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1888, p. 629.)
 — — — — — 1889, p. 273.)
 — — — — — 1889, p. 273.)
 — — — — — 1890, p. 385.)
- SCHMIDT (S.). — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1928, p. 63.)
 — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1930, p. 337.)

- SCHMIDT (S.). — (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 711.)
— (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 714.)
— (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 1095.)
SHATTOCK. — (*Journ. of Pathol. a. Bact.*, 6, 303, 1900.)
THOMSEN. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 586.)
VAILLARD et VINCENT. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1891.)
VAILLARD et ROUGET. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1893, p. 755.)
VINCENT, BETH. — (*Journ. of the Am. med. assoc.*, 70, 1219, 1918.)
WASSERMANN et PROSKAUER. — (*Deut. med. Woch.*, N° 17, 1891.)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	9
<i>Première partie</i>	
Les antitoxines.....	13
Les principales antitoxines connues.....	15
L'origine de l'antitoxine, sa nature et les causes de sa spécificité..	16
Le siège et la situation de l'antitoxine.....	21
Aperçu général des données classiques sur la toxine.....	23
Quelques notions générales sur la nature et les propriétés des toxines microbiennes.....	26
Anatoxine et sa puissance productrice d'antitoxine.....	34
A la recherche d'un vrai vaccin antitoxique.....	34
L'anatoxine diphtérique.....	38
Les propriétés de l'anatoxine diphtérique.....	41
Les principales anatoxines connues.....	48
L'immunité antitoxique et la production de l'antitoxine dans la série animale.....	52
La sérothérapie antitoxique.....	60
<i>Deuxième partie</i>	
De l'aptitude des animaux domestiques à la production des antitoxines..	65
Les différents facteurs de production des antitoxines appartenant en propre aux animaux.....	71
1° Sensibilité des animaux à la toxine diphtérique et tétanique..	71
2° De l'aptitude des animaux d'espèces différentes dans la produc- tion de l'antitoxine.....	77
Recherches personnelles.....	78
3° L'individualité des animaux.....	92
A) De l'immunité d'origine occulte chez le cheval vis-à-vis de l'in- toxication diphtérique.....	94
B) Le phénomène d'iso-agglutination et les groupes sanguins...	98
Iso-agglutination chez les animaux.....	104
Recherches personnelles.....	106
Manuel opératoire.....	107

I. — Mode d'injection de l'anatoxine dans la production de l'antitoxine. — Injection de rappel.....	118
II. — Stimulation de l'organisme producteur d'antitoxine par les substances non spécifiques.....	121
CONCLUSIONS.....	130
Appendice (Le titrage des sérums antitoxiques).....	133
Passages historiques.....	133
Technique de dosage d'un sérum antitoxique d'après la méthode d'Ehrlich.....	136
Manuel opératoire.....	138
Technique d'un dosage de sérum antitoxique par la méthode de floculation de Ramon.....	141
BIBLIOGRAPHIE.....	147



